

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Carmen-Kristiina Parik

Astmaga seotud DNA metülatsiooni muutused veres

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Lili Milani, Ph. D.

Silva Kasela, M. Sc.

Tartu 2014

SISUKORD

LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 ÜLEVAADE ASTMAST.....	5
1.1.1 Epidemioloogia.....	5
1.1.2 Etioloogia.....	5
1.1.3 Organismiga seotud faktorid.....	6
1.1.4 Keskkonna faktorid.....	7
1.1.5 Patogeneesi mehhanismid.....	8
1.1.6 Diagnoosimine.....	9
1.1.7 Astma geneetika.....	10
1.2 ASTMA EPIGENEETIKA.....	13
1.2.1 DNA CpG metülatsioon ja varieeruvus.....	13
1.2.2 DNA metülatsiooni varieeruvuse mõõtmine.....	14
1.2.3 Metülatsiooni detekteerimine kiipide abil bisulfit töötluse puhul.....	15
1.2.4 Ülevaade astmaga seotud DNA metülatsiooni uuringutest.....	17
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	21
2.1 TÖÖ EESMÄRGID.....	21
2.2 MATERJAL JA METOODIKA.....	21
2.2.1 Valimi kirjeldus.....	21
2.2.2 DNA metülatsiooni andmete eeltöötlus.....	23
2.2.3 Erinevalt metüleeritud regioonide leidmine.....	24
2.2.4 Geeniradade analüüs.....	25
2.3 TULEMUSED.....	25
2.3.1 Erinevalt metüleeritud regioonid.....	25
2.3.2 Geeniradade analüüs.....	29
2.4 ARUTELU.....	31
KOKKUVÕTE.....	34
KASUTATUD KIRJANDUS.....	39
LIHTLITSENTS.....	57

LÜHENDID

5mC	5-metüülsütosiin, <i>5-methylcytosine</i>
CpG	tsütosiin-guaaniin dinukleotiid, <i>cytosine and guanine dinucleotide</i>
CGIs	CpG saared, <i>CpG islands</i>
DDE	diklorodifenüül-dikoroetüleen, <i>dichlorodiphenyldichloroethylene</i>
DMR	erinevalt metüleeritud regioon, <i>differentially methylated region</i>
Dnmt	DNA metüültransferaas, <i>DNA methyltransferase</i>
EWAS	epigeneetilised assotsiatsiooni uuringud, <i>epigenome-wide association studies</i>
FDR	valeavastusmäär, <i>false discovery rate</i>
GWAS	üle-genoomsed assotsiatsiooni uuringud, <i>genome-wide association studies</i>
IgE	immunoglobuliin- E; <i>immunoglobuline-E</i>
IL4	nterleukiin-4, <i>interleukine-4</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KMI	kehamassiindeks; <i>body mass index</i>
MeDIP	Metüleeritud DNA immuunosadestamine, <i>methylated DNA immunoprecipitation</i>
MVP	metülatsiooni suhtes varieeruv positsioon, <i>methylation variable positions</i>
PAH	polütsükililiste aromaatsete süsivesinikega, <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PEF	ekspiratoorne tippvool, <i>peak expiratory flow</i>
RSV	respiratoor-süntsütiaal viirus, <i>respiratory syncytial virus</i>
St. hälve	standardhälve, <i>standard deviation</i>
Th1	T-abistajarakk 1; <i>T-helper 1</i>
Th2	T-abistajarakk 2; <i>T-helper 2</i>
TNF- α	tuumori nekroosifaktor alfa, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TÜ EGV	Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu
VMR	varieeruvalt metüleeritud regioon, <i>variably methylated region</i>

SISSEJUHATUS

Astma on geneetilise taustaga krooniline hingamisteede põletikuline komplekshaigus, mille tekkes ja kulus on olulised mitmed keskkonnafaktorid. Astma levimust täiskasvanute seas hinnatakse 5% ja see on tõusuteel, põhjustades olulist koormust ühiskonnale (Masoli jt., 2012).

Vastuvõtlikkus astmale ning haiguse tõsidus tuleneb suuresti genoomi, geenide ja keskkonnategurite vastastikusest mõjust, olles multifaktoriaalne haigus. Tänapäevaks on tänu erinevatele kandidaatgeenide uuringutele ning üle-genoomsetele assotsiatsiooni uuringutele avastatud küll palju astmaga seotud gene, kuid oluline osa põhjuslikkusest ning fenotüübiga seotud küsimustest on veel põhjendamata (Kabesch, 2014).

Arvatakse, et suur osa keskkondlike faktoritega seotud mõjust vahendatakse epigeneetiliste muutustega. Üheks enam uuritud epigeneetiliseks modifikatsiooniks on DNA metülatatsioon. Pikaajalistest keskkonnafaktoritest tingitud DNA metülatatsioonimustrite muutustel võib olla oluline roll, seletamaks haigusespetsiifiliste geenidega seotud muutusi (Rakyan jt., 2011).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida DNA metülatiooni regionaalseid muutusi seoses astmaga ning analüüsida muutustega seotud geenide funktsioone. Töö koosneb kahest osast. Esimese osas antakse ülevaade astmast kui haigusest ning tutvustatakse DNA metülatiooni olemust ning lühidalt kirjeldatakse võimalusi antud modifikatsiooni mõõtmiseks. Lisaks tuuakse välja astmaga seoses läbiviidud uuringute tulemused. Teises, eksperimentaalses osas kirjeldatakse läbiviidud praktilist analüüsi, kasutades Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonorite põhjal moodustatud valimi andmeid. Analüüs hõlmab endas eelnevalt leitud, normaliseeritud ning kvaliteedi-kontrolli läbinud DNA metülatiooni andmetest soovimatute variatsioonide eemaldamist, erinevalt metüleeritud regioonide leidmist ning erinevustega seotud geenide bioloogiliste radade analüüsi.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ülevaade astmast

1.1.1 Epidemioloogia

Astmat peetakse arenenud riikides üheks sagedasemaks krooniliseks haiguseks, mida põeb üle 300 miljoni inimese kogu maailmas (Masoli jt., 2004). Astma globaalne levik on populatsiooniti erinev, hõlmates 1-18% rahvastikust (Masoli jt., 2012). Keskmiselt esineb arsti diagnoositud astma ligi 5% täiskasvanutel vanuses 20-44 aastat (Janson jt., 1997) ning enam kui 10% uuritud lastest (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee jt., 1998). Haiguse levimus on tõusuteel, eriti just laste seas (Latzin, 2013).

Epidemioloogiliste uuringute teostamisel on olulised küsimustikud, hingamisteede hüperreaktiivsuse hindamise testid ja arvatavate etioloogiliste tegurite, sealhulgas atoopilise seisundi määramine (Masoli jt., 2012). Astma levikut on raske määrata, kuna puuduvad ühesed ning objektiivsed diagnostilised testid. Kasutatakse erinevaid meetodeid, samuti erineb haiguse sümptomite interpreteerimine ning professionaalne ja avalik teadlikkus haigusest on riigiti väga erinev (Masoli jt., 2004).

Haigus on enamlevinud just linnades ning vähem esindatud mägistel aladel. Skandinaavia ja Balti riikides oli 2004. aastal astmasse haigestunud inimesi ligi 3,4 miljonit, ca 4,9% kogu populatsioonist (Masoli jt., 2004). Astma sümptomite levik on sarnane kogu regioonis, kuid üleüldine tase on kõrgem Skandinaavia riikides ning madalam Balti riikides. Diagnoositud astma levimus Eestis on väiksem võrreldes teiste riikidega, mis annab alust oletada, et Eestis on astma märkimisväärselt rohkem aladiagnoositud võrreldes Skandinaavia riikidega (Jõgi, 2005).

1.1.2 Etioloogia

Astma levimuse märgatav kasv viimastel aastakümnetel ja haiguse suhteliselt tagasihoidlikum esinemine vähemkindlustatud elanike hulgas viitab keskkonnategurite osatähtsusele astma tekkepõhjusena (Tattersfield jt., 2002). Faktorid, mis on seotud astma riskiga, jagatakse

kaheks: faktorid, mis osalevad astma tekkimisel ning faktorid, mis vallandavad haiguse sümptomid; mõned faktorid mõjutavad mõlemat.

Teket soodustavad faktorid on peamiselt geneetilised (eelsoodumus atoopiale, eelsoodumus hingamisteede hüperreaktiivsusele), kuid määravad on ka rasvumus ning sugu. Vallandavateks faktoriteks on enamasti keskkondlikud tegurid: sise- ja välisallergeenid (sh majaseened, hallitused, loomakarvad, tolmuolmed ning õietolm), infektsioonid (põhiliselt viiruslikud), töokeskkonnaga seotud sensibilisaatorid, tubakasuits, õhusaastatus ning toitained (Busse jt., 2001). Osa keskkondlikest faktoritest, mis mõjutavad astma tekkeriski, kattuvad faktoritega, mis kutsuvad esile astma sümptomite ilmnemise. On tõenäoline, et geenid interakteeruvad nii keskkondlike faktorite kui ka teiste geenidega ning nende koosmõjust on tingitud vastuvõtlikkus astmale (Holgate, 1999; Ober jt., 2005; Ege jt., 2011).

1.1.3 Organismiga seotud faktorid

Geneetilised faktorid: mitmed geenid on seotud astma patogeneesiga (Holloway jt., 1999, DeVries ja Vercelli, 2013) ning need võivad etnilistes gruppides erineda. Astmaga seotud geenide väljaselgitamisel on tähelepanu pööratud neljale põhilisele mehhanismile: 1) allergeenspetsiifiliste IgE antikehade tootmine (atoopia); 2) hingamisteede hüperreaktiivsuse ekspressioon; 3) põletikuliste mediaatorite nagu tsütokiinid, kemokiinid ja kasvufaktorid, aktiveerumine; 4) *T-helper 1* (Th1) ja *T-helper 2* (Th2) immunvastuse rakkude vaheline interaktsioon (Wiesch jt., 1999; Lambrecht ja Hammad, 2013).

Rasvumus: On tõestatud, et astmat esineb enam inimestel, kelle kehamassiindeks (KMI) on üle 30 kg/m². Lisaks on kõrgema KMI-ga inimestel raskem astmat kontrolli all hoida (Ford, 2005; Noal jt., 2011). Rasvunud inimestel on madalam kopsufunktsioon ning kõrgem haigestumus kaasuvatesse haigustesse võrreldes normaalkaalus astmahaigetega (Shore, 2008). Adipotsüüdid vallandavad mitmeid põletikulisi tsütokiine ja mediaatoreid nagu interleukiin-6 (IL-6), tuumori nekroosifaktor alfa (TNF- α), eotaksiin ning leptiin. Nimetatud faktorid võivad rasvunud inimesel soodustada pidevat põletikulist seisundit, kuigi ei ole teada, kuidas on see otseselt seotud hingamisteede funktsiooniga (Juge-Aubry jt., 2005; Shore, 2008).

Sugu: Meessugu peetakse astma riskifaktoriks laste seas. Kuni 14. eluaastani on astmasse haigestunud poisse poole rohkem kui tüdrukuid. Vanuse suurenedes erinevus väheneb ning

täiskasvanueas on astmaatikutel hulgas rohkem naisi kui mehi. Selged seosed sugudevahelise erinevuse ja astmasse haigestumise riski vahel puuduvad (Martinez jt., 1995).

1.1.4 Keskkonna faktorid

Allergeenid: Olenemata sellest, et nii sise- kui välisallergeenid põhjustavad kahtlemata astma ägenemist, ei ole nende rolli astma tekkemehhanismides veel kindlaks tehtud. Allergeenide puhul, mis on pärit tolmukestadest või parasiitidest on tundlikkuse levik otseselt seotud haiguse avaldumisega (Huss jt., 2001). Mõningate andemete kohaselt on tolmukestadel haiguse avaldumisele lisaks roll ka astma kujunemisel (Sears jt., 2003), kuid uuringud on taolise seletuse kahtluse alla seadnud (Charpin jt., 1991).

Infektsioonid: Respiratoor-süntsütiaal viiruse (RSV), rinoviiruse ja paragripi viiruse sümptomiteks on bronhioliit, millel on palju sarnaseid tunnuseid lapsega astmaga (Sigurs jt., 2000; Sly, 2010). Mitmetes pikaajalistes uuringutes on leitud, et umbes 40% lastest, kellel on diagnoositud RSV, püsib hingeldus või esineb astma hilisemas lapseas (Sigurs jt., 2000; Sly jt., 2010). Rinoviirust seostatakse astma seisundi ägenemisega vanematel lastel ning täiskasvanutel (Grunberg jt., 1999; Zambrano jt., 2003). Teisalt on tõendeid, et teatud respiratoorsed viirused võivad aidata ära hoida astma kujunemist (Stein jt., 1999).

Töökeskkonnaga seotud sensibilisaatorid: Üle 400 erineva aine on seostatud kutseastmaga (Venables jt., 1997; Lemiere, 2012). Kutseastmat defineeritakse kui astmat, mille puhul ülitundlikkust põhjustab mingi tegur töökeskkonnas. Siia kuuluvad kõrge reaktiivsusega väikesed molekulid (nt isotsüanaad) ning ärritajad, mis võivad põhjustada muutusi hingamisteede immuunvastuses: platinium soolad, bioaerosoolid, ensüümid, metallid, loomse- ja taimse päritoluga kompleksed bioloogilised produktid, mis stimuleerivad IgE produktsiooni ja teised (Dumas jt., 2014). Töökeskkonnast tingitud astma avaldub eelkõige täiskasvanutel, esinedes ühel patsiendil kümnest (Malo jt., 2007).

Tubakasuits: Tubakasuits on seotud kopsufunktsiooni kiirendatud langusega astmahaigetel (O'Byrne jt., 2009). Samuti suurendab see haiguse raskusastet ning muudab patsiendid ravile vähem vastuvõtlikuks (Chaudhuri jt., 2006). Ka sünnieelset ning sünnijärgset kokkupuudet tubakasuitsuga seostatakse astmale omaste sümptomite tekkega varases lapsepõlves.

Välis- ja siseõhu saastatus: On teada, et lastel, kes on kasvanud saastatud õhuga keskkonnas, on halvenenud kopsufunktsioon (Gauderman jt., 2004), kuid ei ole teada täpset seost saastunud õhu ja kopsufunktsiooni vähenemise vahel. Kindel on seos õhusaastatuse ning astma ägenemiste vahel (Chen jt., 2004). Uuringud näitavad ka, et lastel, kes on sündinud/kasvanud maal, on vähenenud risk haigestuda astmasse (Ege jt., 2008; Lampi jt., 2011).

1.1.5 Patogeneesi mehhanismid

Astmat iseloomustavad 3 põhilist tunnust: (1) vahelduv hingamisteede obstruktsioon, (2) hingamisteede hüperreaktiivsus ja (3) hingamisteede põletik. Astma on krooniline hingamisteede põletikuline seisund, mille teke ning kulg organismis on seotud peamiselt nuumrakkude, eosinofiilide, T-lümfotsüütide ning hingamisteede struktuursete rakkudega (Masoli jt., 2012). Haigusest tingitud põletik on seotud bronhide hüperreaktiivsusega. Astma korral esineb hingamisteedes pidev põletik, kuigi sümptomid avalduvad episooditi ning seos astma raskusastme ning põletiku intensiivsuse vahel ei ole selgelt kindlaks tehtud (Cohn jt., 2004). Põletik hõlmab kogu hingamisteed, kuid füsioloogiline mõju avaldub peamiselt keskmise suurusega bronhides.

Põletikulised rakud astmaatilistes hingamisteedes:

Nuumrakud: Kõrge afiinsusega IgE retseptorid aktiveerivad allergeenide tõttu erinevaid limaskestast nuumrakke, mis vabastavad mediaatoreid (histamiin, tsüsteinüülleukotrieenid ning prostaglandiinid), põhjustades bronhokonstriksiooni ja hingeldust (Galli jt., 2005). Kõrget nuumrakkude arvu hingamisteede silelihases seostatakse ka hingamisteede hüperreaktiivsusega (Robinson, 2004).

Basofiilid: Liiguvad vereringest hingamisteedesse ja teistesse kudedesse astmahoogude ajal, kus moduleerivad nii varast kui hilist tüüpi allergilisi reaktsioone. Basofiilid vabastavad histamiini ja sünteesivad leukotrieeni C4 ning interleukiini IL4 ja IL13. IL4 ja IL13 on peamised tsütokiinid, mis vallandavad Th2-tüüpi tsütokineesi kopsudes (Cromheecke jt., 2014).

Eosinofiilid: Vabastavad katioonseid proteiine, mis võivad kahjustada hingamisteede epiteelrakke (Kay jt., 2004).

T-lümfotsüüdid: Toimub Th2-tüüpi tsütokinees. Vabastavad spetsiifilisi tsütokiine nagu IL-4, IL-5, IL-9 ja IL-13, mis põhjustavad eosinofiilset põletikku ning stimuleerivad IgE produktsiooni B-lümfotsüütide poolt (Larche jt., 2003).

Dendriitrakud: Interakteeruvad regulatoorsete T-rakkudega ning stimuleerivad Th2 rakkude teket naiivsetest T-rakkudest (Kuipers jt., 2004).

Makrofaagid: Aktiveeritakse allergeenide poolt madala afiinsusega IgE retseptorite kaudu, et vabastada põletikulisi mediaatoreid ja tsütokiine, mis võimendavad põletikulist vastust (Peter-Golden, 2004).

Neutrofiilid: Osadel patsientidel on tuvastatud neutrofiilne põletik, kuid neutrofiilide täpne funktsioon astma patofüsioloogias on ebaselge (Wenzel, 2003).

Lisaks põletikuliste rakkudele osalevad astma patogeneesis hingamisteede struktuursed rakud: epiteelrakud, silelihasrakud, endoteelirakud, fibroblastid ja müoblastid. Samuti ka hingamisteede närvirakud (Kudo jt., 2013).

Hingamisteede struktuursed rakud, mis osalevad astma patogeneesis:

Hingamisteede epiteelrakud: Ekspresseerivad astma korral mitmeid põletikulisi proteiine ja vabastavad tsütokiine, kemokiine ja lipiidseid mediaatoreid. Viirused ning õhusaaste allergeenid interakteeruvad hingamisteede epiteelirakkudega.

Hingamisteede silelihasrakud: Ekspresseerivad sarnaseid põletikulisi proteiine nagu epiteelrakud.

Endoteelirakud: Bronhiaalse vereringe endoteelirakud kaasavad põletikulisi rakke vereringest hingamisteedesse.

Fibroblastid ja müoblastid: produtseerivad kollageene ja proteoglükaane, mis osalevad hingamisteede remodelleerimisel.

Hingamisteede närvid: Kolinergilised närvid aktiveerituna võivad põhjustada bronhokonstriksiooni ning lima eritust. Neutrofiilid muudavad tundlikuks sensoorsed närvid ning selle tulemusena ilmnevad sümptomid nagu köhimine, pingetunne rindkeres ning põletikuliste neuropeptiidide vabastamine.

1.1.6 Diagnoosimine

Diagnoosimine põhineb astmale iseloomulikel nähtudel ning anamneesil. Astmat tuleks kahtlustada, kui esinevad kiuned või vilinad rinnus, köha, hingeldus, korduvad hingamisraskused ning pingetunne rindkeres. Eriti juhul, kui sümptomid tekivad või

süvenevad öösiti või olenevalt aastaajast. Lisaks, kui haigusele iseloomulikud tunnused tekivad või süvenevad kokkupuutel karvloomadega, pihustatud kemikaalidega, tolmulestadega, füüsilise koormusega ja/või tubakasuitsuga. Haigust tuleks kahtlustada ka, kui mõnel pereliikmel esineb astma või mõni muu atoopiline haigus. Indiviidil esineb astma, kui sümptomid taanduvad astma raviga (Astma ravi ja ennetamise lühiversioon, 2006).

Astma diagnoosimiseks on oluline: 1) hingamisteede obstruktsiooni kindlakstegemine, 2) selle taaspöörduvuse dokumenteerimine.

Diagnoosi kinnitamiseks kasutatakse kaht meetodit (Astma ravi ja ennetamise lühiversioon, 2006): forsseeritud voolu-mahu spirofraagia ehk kopsufunktsiooni mõõtmine forsseeritud väljahingamise ajal ekspiratoorse tippvoolu ehk PEF mõõtmine. Taaspöörduvust hinnatakse samade mõõtmismeetoditega. Alla 5. aastastel lastel diagnoositakse astmat sümptomite ja arsti kliinilise hinnangu alusel.

1.1.7 Astma geneetika

Fakti, et astma on geneetilise taustaga haigus, on läbi erinevate uuringute näidatud alates kahekümnenda sajandi algusest (Wiener jt., 1938). Tänapäevaks on erinevate meetodite abil leitud üle 100 erineva geeni, mida seostatakse astma avaldumisega (Laitinen jt., 1998; Thomsen jt., 2010; Cortessis jt., 2012).

Eelsoodumus astma tekkeks (vastuvõtlikkus astmale) ning haiguse raskus tuleneb geenide ning keskkondlike faktorite vahelistest interaktsioonidest elu erinevate etappide vältel. Üha enam leitakse tõendusmaterjali selle kohta, et geenid, mis osalevad haiguse kulus ning raskusastmes, erinevad geenidest, mis on seotud haiguse vastuvõtlikkusega (Li jt., 2012). Geenid, mis on seotud haiguse vastuvõtlikkusega, interakteeruvad keskkondlike riskifaktoritega, põhjustades varajast kergekujulist või periooditi avalduvat astmat. Neist erinevad geenid interakteeruvad täiendavate keskkondlike teguritega või epigeneetiliste faktoritega, mille koosmõjul haigus progresseerub (Meyers jt., 2014).

Astmaga seotud geenide leidmiseks kasutati algselt kahte meetodit: (1) üle-genoomsed aheldatuse uuringud; (2) kandidaatgeeni uuringud. Esimese meetodi keskmeks on suguvõsa, mis koosneb astma diagnoosiga inimestest. Indiviidide kromosoomid genotüpiseeritakse ning otsitakse haigete genoomis välja need regioonid, kus suguvõsas jagatud alleelide arv oleks suurem kui eeldada võiks. Sellest järeldub, et antud genoomiregioonis asub haiguse

eelsoodumuslik geen. Kandidaatgeeni uuringute fookuses on väljavalitud geenid, mida seostatakse haiguse patogeneesi mehhanismidega (Vercelli, 2008). Oluliseimad leiud antud meetoditega olid geenid *IL4*, *IL13*, *CD14*, *ADRB2*, *SPINK5*, *LTC4S* (Wills-Karp jt., 2004).

Viimase aastakümne vältel on laialdaselt tehtud üle-genoomseid assotsiatsiooniuuringuid (GWAS, *genome-wide association studies*), et mõista erinevate haiguste, sealhulgas ka astma, geneetilisi põhjuseid (Altshuler jt., 2008; McCarthy jt., 2008). GWAS uuringu eesmärgiks on hüpoteesivabalt tuvastada geene, mis osalevad haiguse kujunemisel ning kulus.

Esimese laialdase astma GWAS uuringu tulemused raporteeriti 2007. aastal Moffatt ja kolleegide poolt, kes tuvastasid uue astmaga seotud lookuse 17. kromosoomis (17q21), mis sisaldas mitmeid geene, nende hulgas ka *ORMDL3* ja *GSDMB* (Moffatt jt., 2007). 17q21 on olnud järgnevates GWAS uuringutes kõige indentifitseeritum lookus, mida on seotud astmaga (Moffatt jt., 2010; Torgerson jt., 2011).

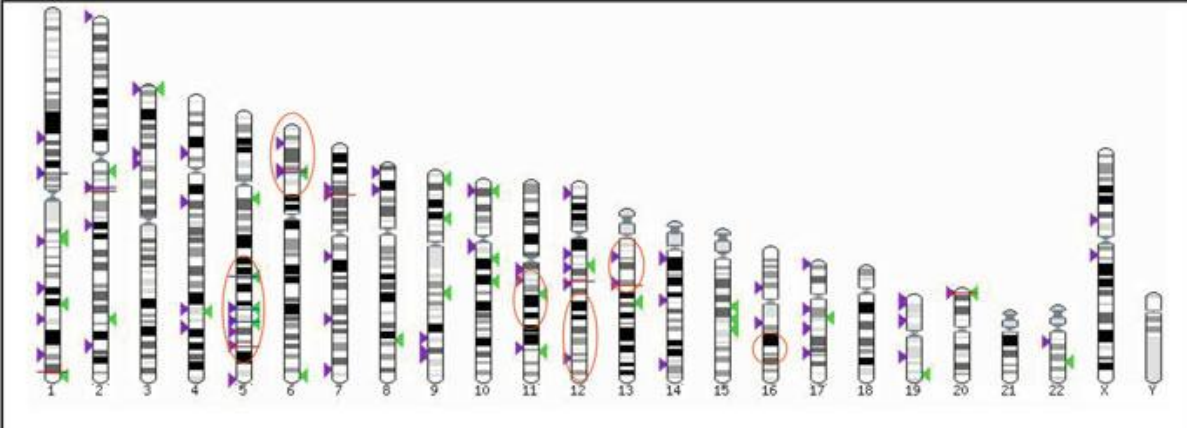
GWAS uuringute käigus saadud tulemusi saab rakendada geenide ning keskkonnavaheliste interaktsioonide leidmiseks. Näiteks on uuritud *ORMDL3-GSDMB* lookuste seost astma kujunemisega lastel. Analüüsist ilmnes, et lastel, kellel on esinenud rinoviirusega seotud hingeldus varases lapseas arenes astma, kuid nendel lastel, kellel hingeldus oli tingitud respiratoor-süntsütiaalviirusest, astmat ei arenenud (Calışkan jt., 2013).

2010. aastal raporteeris Euroopa GABRIEL Konsortsium tulemused järjekordsest astma GWAS analüüsist, identifitseerides mitmeid astma riskiga seotud geene- *IL1R1/IL18R12*, *HLA-DQ*, *IL33*, *SMAD3*, *IL2RB* (Moffatt jt., 2010). Geenil *ORMDL3-GSDMB* leiti oluline seos lapsea astma kujunemisega (Moffatt jt., 2010). 2011. aastal raporteeriti esimene GWAS analüüs astma reageerimisest kortikosteroidsele ravile, millest selgus ühe geeni, *GLCCI* ekspressiooni langus kopsu- ja lümfoïdkoes, pärast glükokortikosterodide inhaleerimist (Tantisira jt., 2011).

2012. aastal avaldati tulemused GWAS uuringust, mis uuris astma kopsu funktsiooni ning selle tulemusel selgus, et *TNIP1* on astmat ärahoidev geen, kuid samal ajal väga oluline riskialleel luupuse tekkel (Li jt., 2012).

Uuringud on küll olnud edukad identifitseerimaks hulga geene, mis vihjavad bioloogilisele tähtsusele astma kujunemisel (Moffatt jt., 2010), kuid ei ole andnud kuigi edukaid tulemusi

seletamaks haiguse fenotüübilist varieeruvust - olukorda, mida tuntakse kui peidetud pärilikkust (Li jt., 2012). Sellest tuleneb ka huvi astma epigeneetika vastu. Astmaga seotud epigeneetilisi uuringuid käsitletakse järgnevas peatükis.

				
Geenid, mis on leitud läbi positsionaalse kloneerimise (Ober ja Yao, 2011)				
1qter: CHML 7p14: NPSR1	2q14: DPP10 13q14: PHF11	12q14: IRAK2 20p13: ADAM33	5q33: CYFIP2	6p21: HLA-G
Geenid, mis on leitud läbi positsionaalse kloneerimise (Ober ja Yao, 2011)				
1p13: GSTM1 6p21: HLA-G, TNF	2q13: IL1RN 20p13: ADAM33	5q22.1: TSLP	5q23: IL13	5q31: CD14
Geenid, mis on leitud kandidaatgeenide meetodi abil (Ober jt., 2006; Ober ja Yao, 2011)				
1p22: CLCA1 1q42: AGT 2q35: IL8RA 4q13: MUC7, IL8 5q32: UGRP1, SPINK5 5q35: LTC4S 6p21: LTA, TNF, HLA-DRB1 7q11: CCL26, CCL24 9q31: IKAP 11q12: FCER1B, CRTH2, CC16/CC10 12q13: VDR, STAT6 13q14: CYSLTR2, PHF11 14q32: AACT/SERPINA3 17q12: CCL2, CCL11, CCL5 19p13: TBXA2R, C3, IL12RB1 Xp11: TIMP1	1p13: GSTM1, CHIA 2p25: ACP1 3p26: IL5RA 4q31: IL15, TLR2 5q32-34: ADRB2 6p24: EDN1 7q31: CFTR 9q33: TLR4, C5 12q15: IFNG 12q15: PGDS 16p12: IL4RA	1q22: DAP3 2q13: IL1B, IL1RN 3p21: CCR3, CCR5, TLR9 5q23: IL3, CSF2, IRF1, IL13, IL4 5q33: HAVCR1, HAVCR2, CYFIP2 6p22: HLA-G 7q36: NOS3 10p14: GATA3 11q13: GSTP1 12q24: NOS1 14q11: CMA1 16q12: CARD15 17q21: ITGB3, TBX21 19q13: TGFB1 Xq13: CXCR3	1q31: COX2 2q14: DPP10 4p14: TLR10 5q31: CD14 5q31-33: IL12B 7p15: NOD1 8p23: DEFB1 10q11: CXCL12, ALOX5 11q23: IL18 13q12: FLAP 14q22: PTGDR, PTGER2 6p12: PAFAH 17q23: ACE 20p13: ADAM33	1q32: IL10 2q22: HNMT 4p13: TLR6 5q31: CD14 5q31-33: IL12B 7p14: GPRPA 8p22: NAT2 12p13: C3AR1, AICDA 22q11: MIF, GSTT1
Geenid, mis on leitud ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute kaudu (www.genome.gov/gwastudies)				
1q21.3: CRCT1, IL6R 2q12.1: IL1RL1, IL18R1, IL1R1 4q31.21: LOC729675, GAB1 5q31.1: SLC22A5, C5orf56, RAD50, IL13 6p21.32: PBX2, NOTCH4, C6orf10, BTNL2, HLA-DRA, HLA-DQ, HLA-DPA1, HLA-DPB1 8q24.11: SLC30A8 10q21.1: PRKG1 13q21.31: PCDH20 17q12: GSDMB, ORMDL3 22q12.3: IL2RB	1q23.1: PYHIN1 9p24.1: IL33 10q21.3: CTNNA3 15q21.2: SCG3	1q31.3: CRB1, DENND1B 2q33.1: SPATS2L 5q12.1: PDE4D 5q31.3: NDFIP1 9p21.1: ACO1 11q13.5: LRRC32 15q22.2: RORA 17q21.1: GSDMA	3p26.2: IL5RA 5q22.1: TSLP 9q21.31: CHCHD9, TLE4 11q23.2: C11orf71 15q22.33: SMAD3 19q13.42: ZNF665	1q44: C1orf100 6q27: GAPDHP72 - T 10p14: LOC338591 12q13.2: CDK2, IKZF4 20p13: KIAA1271

Joonis 1. Kokkuvõte astma fenotüübi geneetilistest lookustest erinevate uurigute alusel (Mathias, 2014). Geenid leitud läbi kandidaatgeenide meetodi on näidatud lilla noolega vasakul pool kromosoome. Üle-genoomsete assotsiatsiooni uuringutega identifitseeritud geenid on joonisel tähistatud rohelse noolega paremal pool kromosoome. Geenid, mis osalevad geeni ja keskkonna vahelistes interaktsioonides, ning geenid, mis on tuvastatud

positsiooni kloonimise meetodil, on märgitud horisontaalse punase joontega. Kromosoomi piirkonnad, millel on leitud suurim seos astmaga, on tähistatud punase ringiga kromosoomides 5, 6, 11, 12, 13 ja 16.

1.2 Astma epigeneetika

1.2.1 DNA CpG metülatsioon ja varieeruvus

DNA metülatsioon on üheks enam uuritud epigeneetiliseks modifikatsiooniks, kuna sellel on oluline roll geeniekspressiooni regulatsioonis. Epigeneetika uurib genoomi tasandil toimuvaid muutusi, mis mõjutavad geeniekspressiooni, kuid ei muuda seejuures DNA järjestust (Skinner jt., 2010). DNA metülatsioon ja muutused metülatsioonimustris on vajalikud raku diferentseerumise seisukohalt ning organismi normaalseks arenguks. Ebakorrapärasest metülatsioonist seostatakse mitmete haiguste, sealhulgas vähkkasvajatega ja autoimmuunhaigustega (Rakyan jt., 2008; Deaton ja Bird, 2011).

Metüleerimine on biokeemiline protsess, mille käigus DNA metüültransferaaside (Dnmt) vahendusel lisatakse metüülrühm ($-CH_3$) tütosüüli pürimidiini 5' süsinikule, moodustades 5-metüülsütosüüli (5mC) (Jeltsch, 2006, Heinaru, 2012). Imetajate puhul toimub taoline modifikatsioon põhiliselt nende C nukleotiidide puhul, millele järgneb nukleotiid G, seda nimetatakse CpG saidiks (Jaffe jt., 2012). Imetajatel on umbes 28 miljonit CpG saiti, mis paiknevad hajusalt üle kogu genoomi, kuid esineb ka lühemaid CpG rikkaid regioone - CpG saarekesed (Ng ja Bird, 1999). On teada, et 70–80% CpGdest esineb 5-metüülsütosüüli vormina (Bock 2012). DNA metülatsiooni on laialdaselt uuritud, kuna seda on seostatud mitmete bioloogiliste protsessidega nagu (1) genoomne *imprinting*, mis viib monoalleelse vanemspetsiifilise geeni ekspressioonini (Barlow, 2011), (2) transponeeruvate elementide vaigistamine (Bestor, 1998), (3) tüvirakkude diferentseerumine (Meissner, 2010), (4) embrüonaalne areng (Reik, 2010) (5) ning kroonilise põletiku mehhanismid (Martin ja Herceg, 2012).

DNA metülatsioon osaleb transkriptsiooni repressiooni regulatsioonis ning geeni vaigistamisel. Koos teiste epigeneetiliste mehhanismidega on DNA metülatsiooni funktsiooniks teatud geenide sisse- ning väljalülitamine. Olenevalt kromosomaalsest piirkonnast, raku tüübist, arengu staadiumist, alleelidest ning vanemlikust pärilikkusest, võib CpG sait olla kas

metüleeritud, metüleerimata või harva ka poolmetüleeritud, kus metülatsioon on toimunud vaid ühel DNA ahelal (Rakyan, 2011; Reinius, 2012). Lisaks esineb ka koespetsiifilist metülatsiooni ning metülatsiooni tasemed võivad koe rakkudes või alleelides olla erinevad, sõltuvalt vanemlikust päritolust (Rakyan, 2011).

Metülatsiooni erinevusi ühe CpG puhul nimetatakse metülatsiooni suhtes varieeruvateks positsioonideks (MVP, *methylation variable positions*) (Rakyan, 2004). DNA metülatsiooni erinevusi mitmes kõrvuti paiknevas CpG saidis nimetatakse erinevalt metüleeritud regioonideks (DMR, *differentially methylated region*). Erinevalt metüleeritud regioone jagatakse konteksti spetsiifiliselt, näiteks koespetsiifiline DMR, vanusespetsiifiline DMR. Enamasti on DMRi pikkus vähem kui 1000 aluspaari, kuid leidub ka selliseid, mille pikkus ületab miljon aluspaari (Frigola jt 2006). Esinevad veel varieeruvalt metüleeritud regioonid (VMP, *variably methylated region*), kus mitu CpG saiti on järjest sarnaselt metüleeritud ning seda iseloomustab metülatsiooni suurenenud muutlikus, mitte metülatsiooni kasvamine või kadumine.

CpG-saared (CGIs, *CpG islands*) on CpG saitide rikkad regioonid. Enamus CpG-saartest on kõikides rakutüüpides mittemetüleeritud. Inimese genoomis on umbes 30 000 CpG-saart ning need on enamasti 500 kuni 2000 aluspaari pikad (Heinaru, 2012). CpG-saarte vahetus läheduses asuvad CpG-kaldad (*CGI shores*). CpG-kaldad on metülatsiooni suhtes varieeruvamad, kuigi CpG-saitide tihedus neis on madalam, võrreldes CpG-saartega (Rakyan, 2011).

1.2.2 DNA metülatsiooni varieeruvuse mõõtmine

DNA metülatsiooni mõõtmise teeb keeruliseks asjaolu, et kuigi igal organismil on üks genoom, siis epigenoome võib samal organismil olla sadu, kuna DNA metülatsioon on muutuv erinevates rakkudes ning organismi arengufaasides või omane teatud haigustele ning keskkondlikele mõjuteguritele.

Bisulfit töötlus

DNA metülatsiooni varieeruvuse mõõtmise põhiliseimaks meetodiks on metülatsiooni detekterimine bisulfit töötluse abil. Selle käigus muudetakse metüleerimata tsütosiin (C) uratsiiliks (U) ning metüleeritud tsütosiinid jäävad muutmata. Muudetud uratsiili alused muudetakse amplifikatsiooni käigus tümiini (T) alusteks.

Bisulfit töötuse järgselt on võimalik metülatsiooni tuvastada kas sekveneerides või kasutades kiibipõhiseid meetodeid. Bisulfit meetodil töödeldud DNA analüüsimisel annab parima aluspaarilise täpsuse sekveneerimine, kasutades kas Sangeri sekveneerimist või teise põlvkonna sekveneerimist. Analüüse viidi algselt läbi kasutades Sangeri sekveneerimist, mille käigus sekveneeritakse ühelt lookuselt saadud kloonitud PCR produkte, mis on tehtud kahe komplekti ahelseptsiifiliste praimeritega, mis viivad kahe erineva fragmendi tekkeni, milles kõik uratsiilid on muutunud tümiiniks ning metüleeritud tsütosiinid on amplifitseeritud tsütosiinidena (Frommer jt., 1994). Sangeveri sekveneerimise abil DNA metülatsiooni tuvastamine on aga aeganõudev.

Nüüdseks on tänu teise põlvkonna sekveneerimise meetoditele võimalik paralleelselt sekveneerida üle 100 PCR produkti või isegi kogu genoomi (Margulies jt., 2005). Mehhanisme on erinevaid, kuid kõik põhinevad meetodil, et aluseks olev DNA on kinnitud teatud tahkele kandjale, mis võimaldab miljonite fragmentide üheaegset amplifikatsiooni ning sekveneerimist ühe molekuli kaupa (Metzker, 2010).

DNA metülatsiooni tuvastamiseks on spetsiaalsetes kiipides kasutusel kaks saidi-spetsiifilist oligonukleotiidi, mis tunnevad vastavalt ära kas metüleeritud lookuse (M) või metüleerimata lookuse (U).

Metüleeritud DNA rikastamine antikehadega

Metüleeritud DNA immuunosadestamine (MeDIP - *methylated DNA immunoprecipitation*) on meetod, milles kasutatakse metüleeritud DNA sadestamiseks metüültsütosiini vastast antikeha ning seejärel hübridiseeritakse see immuunosadestatud DNA mikrokiipidele. Antud meetodi limiteerivaks asjaoluks on see, et genoomi katvus hübridisatsiooni kiibil on limiteeritud, aga CpG saitide hajuvus genoomis on ebaühtlane (Weber jt., 2005). Immuunosadestatud DNAd on võimalik analüüsida ka teise põlvkonna sekvenaatoril, mis kvantiseerib regioonide metülatsioonitasemeid ühtlasemalt ja täpsemalt.

1.2.3 Metülatsiooni detekteerimine kiipide abil bisulfit töötuse puhul

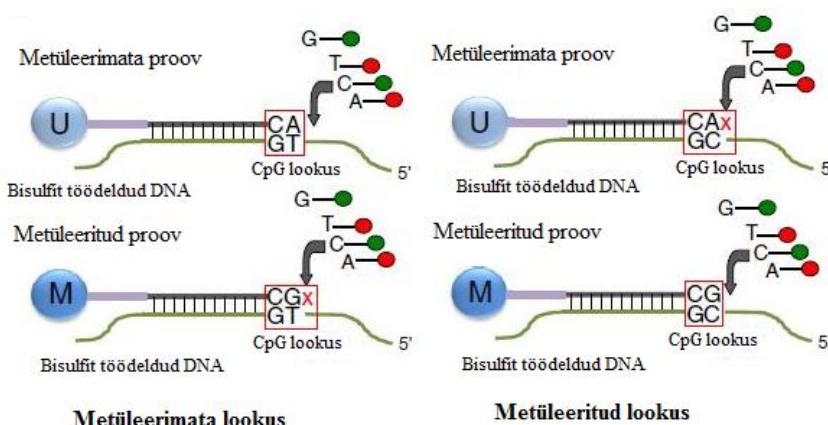
Illumina poolt väljatöötatud kiip *Illumina HumanMethylation450BeadChip* võimaldab hinnata üle 485 000 CpG lookust enam kui 21 000 geenis üle kogu genoomi (Illumina Inc.). Bisulfit töötuse käigus metüleerimata tsütosiinalused muudetakse uratsiiliks ning

metüleeritud tsütosiin jääb muutumata. Muudetud uratsiil muutub järgneva amplifikatsiooni käigus tümiiniks.

Tehnoloogia koosneb *Infinium* tüüp I ja *Infinium* tüüp II oligonukleotiididest, kus iga CpG on hinnatav kahe suurusega: metüleeritud ja metüleerimata alleelide näitaja. Mõlema tüübi puhul kasutatakse 50 nukleotiidi pikkuseid proove, mis seonduvad kindlate positsioonidega DNA ahelas, kus asuvad CpG saidid (Bibikova jt., 2011).

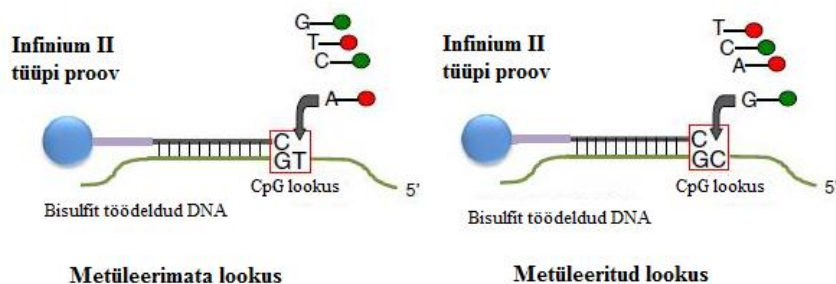
Infinium 450K kiibi peal on kokku 485 577 proovi, millest 135 502 on tüüp I oligonukleotiidid (28%) ja 350 076 on tüüp II oligonukleotiidid (72%).

I tüüpi oligonukleotiidide puhul on metülatsioonitaseme määramiseks fluoretsi abil kasutusel üks värvitoon (punane või roheline) ja kaks erinevalt disainitud oligonukleotiidi (U ja M), mis lastakse läbi ühe värvikanali. Oligonukleotiidi U vastab metüleerimata lookusele ning oligonukleotiidi M vastab metüleeritud lookusele, kujutatud joonisel 2. (Maksimovic jt., 2012).



Joonis 2. *Infinium* 450K tüüp I oligonukleotiididega metülatsiooni detekteerimine.

II tüüpi oligonukleotiidide puhul kasutatakse ühte tüüpi disainitud proove ja kahte erinevat värvitooni metüleeritud ning metüleerimata CpG lookuste määramiseks, kujutatud joonisel 3 (Bibikova jt., 2011).



Joonis 3 *Infinium* 450K tüüp II oligonukleotiididega metülatsiooni detekteerimine.

Mõlema, nii tüüp I proovide kui tüüp II proovide puhul on metülatsiooni tase CpG lookuses leitav metüleeritud ja metüleerimata proovide funktsioonina.

1.2.4 Ülevaade astmaga seotud DNA metülatsiooni uuringutest

Koe- ning ajaspetsiifiline geenide avaldumine rakus on reguleeritud peamiselt epigeneetiliselt. Epigeneetika uurib genoomi tasandil toimuvaid mitootiliselt ja meiootiliselt pärilikke keskkonnatoimelisi muutlikkusi ehk muutusi geneetilises materjalis, mis mõjutavad geeniekspressiooni, kuid ei muuda seejuures DNA järjestust (Skinner jt., 2010; Heinaru, 2012). Huvi astma epigeneetika uurimise vastu on suur, kuna üldtunnustatud on astma kui haiguse heterogeensus ning arvatakse, et epigeneetilised mehhanismid soodustavad haiguse keskkondlikku põlvnemist ja fenotüübilist varieeruvust (Montuschi ja Barnes, 2011). Keskkondlike mõjude suurt rolli astma korral rõhutab ka selle levimuse järsk suurenemine viimase paari aastakümne jooksul — tendents, mis pole seletatav üksnes geneetiliste mehhanismidega. Põhilised epigeneetilised variatsioonid, mida praegusel ajal astma etioloogia mõistmiseks uuritakse on (Bird, 2007):

1. DNA metülatsioon
2. histoonide modifikatsioon
3. mikroRNAd

Mitmed uuringud on seostanud astma patogeneesis olulisi keskkondlikke tegureid epigeneetiliste muutustega, samas on vaid üksikud uuringud seostanud epigeneetilisi variatsioone astma tekke ja kujunemisega (Cortessis jt., 2012).

Epigeneetiliste muutuste uurimiseks astma korral on läbi viidud nii ülegenoomseid assotsiatsiooniuuringuid kui ka kandidaatgeeni uuringuid. GWAS on disainitud selleks, et

leida seoiseid geneetilise variatsiooni ja vaadeldava tunnuse või haiguse esinemise vahel. Viimastel aastatel genoomi epigeneetiliste variantide ja haiguse esinemise vaheliste seoste paremaks leidmiseks kasutusele võetud epigeneetilised assotsiatsiooni uuringud (EWAS, *epigenome-wide association studies*) (MacArthur, 2008). EWAS abil uuritakse kas ja millised genoomi piirkonnad on erinevalt metüleeritud konkreetse haiguse või seisundi puhul. Selliste regioonide leidmine annab teavet võimalike seotud geenide, geeniradade ja funktsionaalsete radade kohta ning seostab neid haiguse fenotüübiga epigeneetiliste mehhanismide vahendusel (DeVries jt, 2013).

Enamasti on analüüsi fookuses seos mingi kindla koe DNA metülatsiooni ning haiguse esinemise või mõne muu karakteristikuga nagu teatud keskkondlikud tegurid, vahel (Michels jt., 2013). Tabelis 1 on kokkuvõtlikult esitatud EWAS uuringute tulemused astma ja allergiliste seisundite korral.

Erinevalt ülegenoomsetest uuringutest on kandidaatgeeni uuringud suunatud DNA metülatsiooni määramisele geenides, mis teadaolevalt või eeldatavalt on seotud immuunvastusega või astma kui haiguse patogeneesiga. Enamus uuringuid astma korral on käsitletud neid kandidaatgeene, millele omistatakse rolli reaktsioonis keskkonda saastavate faktorite suhtes (DeVries jt, 2013). Tabelis 2 on kokkuvõtlikult esitatud kandidaatgeeni uuringute tulemused.

Erinevalt kasvajatest on teiste komplekshaiguste, sealhulgas astma korral leitud DNA metülatsiooni erinevused küllaltki väikesed, mis teeb tulemuste interpreteerimise keeruliseks. Samas eeldatakse, et teatud CpG saitide reguleerivad omadused võivad olla vahendatud nn. lävendi-efekti kaudu, selliselt et väikesed kvantitatiivsed erinevused DNA metülatsioonis võivad põhjustada suuremaid kvalitatiivseid muutusi seotud funktsionaalsetes radades (nt RNA ja/või valgu ekspressioonis) (DeVries jt, 2013).

Tabel 1. Kokkuvõte EWAS uuringute tulemustest

Fenotüüp	Ekspositsioon	Kiip	Tulemused	Autorid
Atoopiline astma	Ülitundlikkus dermatofüütide suhtes	Illumina 27K methylati on beadchip	CpG sait geeni <i>LCN6</i> oli erinevalt metüleeritud võrreldes asmaatikuid ja kontrolli. Atoopilise astmaga indiviidide bronhiaalsest limaskestast detekteeriti 6 lookust 6 erinevast geenist, mis olid hüpermetüleeritud, kuid 49 lookust 48. geenist olid hüpometüleeritud	Kim jt., 2013
Astma	Keskkonna saastatus	Illumina 27K methylati on beadchip	Kahes erinevas linnas elavate laste 9916 CpG saiti oli erinevalt metüleeritud. Linnas, kus oli kõrge õhusaastatus, oli 58 saidi erinevus üle 10% ning olles konstantselt hüpometüleeritud.	Rossnerova jt., 2013
Lapseea ning täiskasvanuea astma	Ema raseduseaegne suitsetamine	Illumina 450K methylati on beadchip	26 CpG saiti 10 geenis olid erinevalt metüleeritud.	Joubert jt., 2012
Astmaga seotud püsiv hingeldus;	Prenataalne diklorodifenüül-dikoroetüleen (DDE)	Illumina GoldenGate Methylati on panel	Geeni <i>ALOX12</i> hüpometülatsioon oli seotud püsiva hingelduse riskiga. Kõrged prenataalsed DDE väärtused olid seotud <i>ALOX12</i> geeni hüpometülatsiooniga,	Morales jt., 2012A
Allergiline astma, aspiriini poolt ägestatud respiratoorne haigus	Dermatofüütide allergia	HELP assay	<i>CYP26A1</i> geeni promootor oli allergilise astmaga indiviididel hüpermetüleeritud. Allergiaga grupis täheldati tendentsi üldise hüpometülatsiooni suunas võrreldes kontrollgrupiga	Pascual jt., 2011
Astma diagnoos puudub	Prenataalne kokkupuude tubakasuitsuga	Illumina GoldenGate Methylati on panel	Lastel, kes oli sünnieelselt tubakasuitsule eksponeeritud, olid geenid <i>AXL</i> ja <i>PTPRO</i> hüpermetüleeritud	Breton jt., 2009
Astma sümptomid väikelapseas (enne 5 eluaastat)	Rasedusaegne kokkupuude polütsükliliste aromaatsete süsivesinikega (PAH)	Methylati on sensitive restriction fingerprin ting	Geeni <i>ACSL3</i> hüpermetülatsiooni seos astmaga, mis tingitud eksponeeritusest PAH'dele	Perera jt., 2009

Tabel 2. Kokkuvõte kandidaatgeenide uuringute tulemustest

Fenotüüp	Ekspositsioon/tunnus	Kandidaat-geenid	Tulemus	Autorid
Lapseea astma	põllumajandus; vanus	<i>ORMDL1-3</i> , <i>CHI3L1</i> , <i>RAD50</i> , <i>IL13</i> , <i>IL4</i> , <i>STAT6</i> , <i>FOXP3</i> , <i>RUNX3</i>	<i>ORMDL1</i> ja <i>STAT6</i> hüpometaüleeritud, <i>RAD50</i> ja <i>IL13</i> hüpermetaüleeritud astmaga indiviididel. DNA metülatiooni muutused sünni ja 4,5 eluaasta vahel ilmsid astmaga seotud geenides (<i>ORMDL</i>) ja IgE regulatsiooniga seotud geenides (<i>RAD50</i> , <i>IL13</i> ja <i>IL4</i>), aga mitte T-lümfotsüütidega seotud geenides (<i>FOXP3</i> , <i>RUNX3</i>)	Michel jt, 2013
Allergiline astma	Suitsetamine raseduse ajal ja uuringu ajal suitsetamine	<i>NPSR1</i>	<i>NPSR1</i> promootori metülatatsioon madalam allergilise astmaga laste perifeerses veres. DNA metülatatsioon oli oluliselt seotud vanemate suitsetamisega, ning aastaajaga, mil lastelt proovid võeti. Täiskasvanutel oli DNA metülatatsioon oluliselt seotud suitsetamisega (hetkel või anamneesis)	Reinius jt, 2013
Astma 18-aastaste grupis		<i>IL4R</i>	Astma riskiga seotud <i>IL4R</i> SNP rs3024685 oli omakorda seotud metülatatsiooniga saidis CG09791102	Soto-Ramirez jt, 2013
Lapseea astma;	Fraktsionaalselt väljahingatav lämmastikoksiid (FeNO)	<i>IL6</i> , <i>iNOS</i>	Hüpometaüleeritud <i>IL6</i> ja <i>iNOS</i> promootoris oli seotud tõusnud FeNO tasemega	Baccarelli jt, 2012
Lapseea astma;	lämmastik dioksiid (NO ₂)	<i>ADRB2</i>	<i>ADRB2</i> metülatatsioon oli positiivses seoses astma raskusega. Kokkupuude NO ₂ ja raskekujulise astma esinemine oli lastel seotud <i>ADRB2</i> hüpermetaüleeritud	Fu jt, 2012
Astma diagnoos puudub	Põllumajandus	<i>CD14</i>	<i>CD14</i> promootor oli oluliselt hüpometaüleeritud nende rasedate platsentas, kes elasid talukohas	Slaats jt, 2012
Astma diagnoos puudub	Raseduseaegne kokkupuude polütsükliliste aromaatsete süsivesikutega	<i>IL4</i> , <i>IFNG</i>	Ema kokkupuude polütsükliliste aromaatsete süsivesikutega oli seotud <i>IFNG</i> hüpermetaüleeritud nabavädi veres	Tang jt, 2012
Lapseea astma;	FeNO	<i>ARG1</i> , <i>ARG2</i> , <i>NOS</i>	<i>ARG2</i> hüpermetaüleeritud oli pöördvõrdelises seoses FeNO tasemega.	Breton jt, 2011
Allergiline astma;	tolmulesta allergia	<i>PTGDR</i>	<i>PTGDR</i> oli hüpometaüleeritud allergikutel	Isidoro-Garcia jt, 2011
Astma raskusaste;	õhu saastatuse aste	<i>FOXP3</i>	Lastel, kes olid kõrge õhusaastatusega piirkonnast, esines <i>FOXP3</i> hüpermetaüleeritud ning raskema kuluga astma.	Nadeau jt, 2010

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö praktilise osa eesmärgiks oli

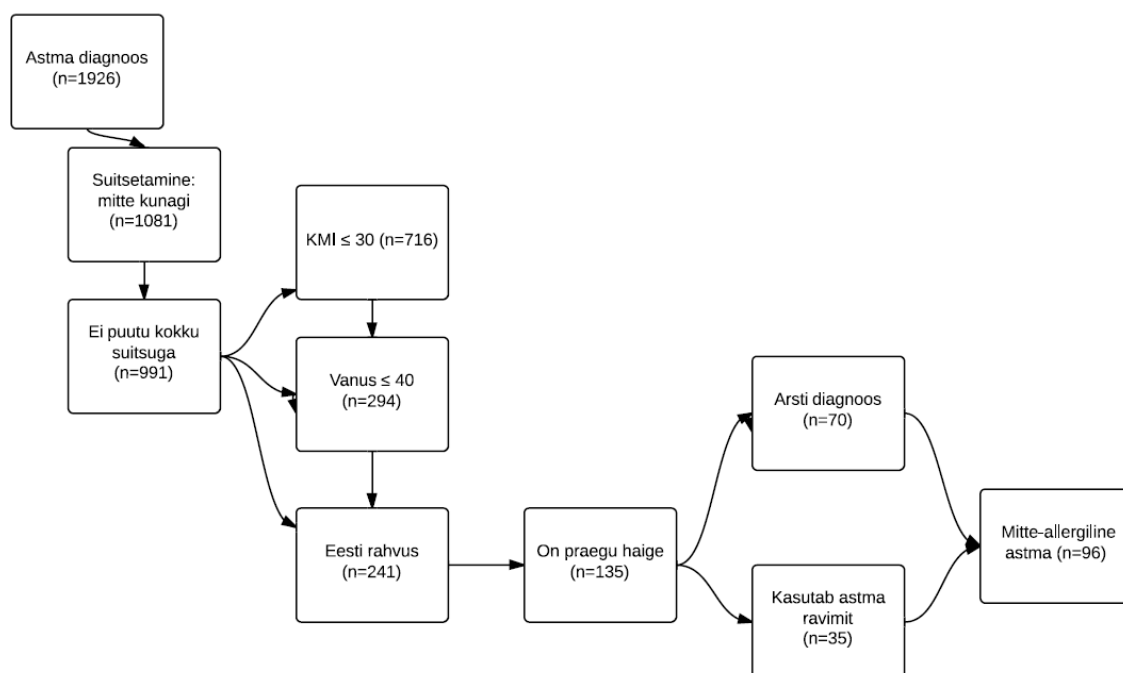
- 1) Viia läbi epigeneetiline assotsiatsiooniuuring (EWAS), et leida seoseid astma esinemise ja erinevate metülatsioonimustrite vahel, kasutades assotsiatsiooni uuringuks ülegenoomseid DNA metülatsiooni kiipe.
- 2) Analüüsida astmaga seotud DNA metülatsioonimuutustega geenide funktsioone ja bioloogilisi radasid.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Valimi kirjeldus

Uurimaks seoseid astma esinemise ja erinevate DNA metülatsioonimustrite vahel kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) geenidoonorite andmeid. TÜ EGV on Eesti rahva tervise-, sugupuu- ja geenandmete kogu, millega on liitunud vabatahtlikult ligi 52 000 inimest – ligi 5% Eesti täiskasvanud elanikkonnast.

Koostamaks võimalikult homogeenne valim, valiti kõigepealt TÜ EGV andmebaasist 1926 astma diagnoosiga indiviidi seast välja need, kes pole kunagi suitsetanud (aktiivselt ega passivselt), olid normaalkaalus, kuni 40. aasta vanused ja eesti rahvusest (täpsemalt kirjeldatud joonisel 4). Kindlaks diagnoosiks selekteeriti individid edasi kahel viisil: individid, kellel on arsti (pere- või eriarst) poolt diagnoositud astma (n=58) või need, kes raporteerisid, et neil esineb astma (n=35). Viimaste puhul kinnitati TÜ EGV andmebaasist üle, et nad oleksid raporteerinud ka astma ravimi tarvitamise. Igale haigele valiti TÜ EGV andmebaasist soo, vanuse ja KMI poolest vastav kontroll, kellel ei esinenud astmat.



Joonis 4. Astmaatikute selektsioon uuritud valimisse geenidoonorite andmekogu alusel

Lõpliku valimi moodustasid 93 astmaatikut ja 93 kontrolli (tabel 3). Uuritavatest 67 indiviidi olid mehed (36%) ning 119 naised (64%). Noorima geenidoonori vanus oli 18 eluaastat ning vanim doonor oli 40-aastane. Tabeli põhjal on võimalik kinnitada, et kaks uuritavad gruppi on homogeensed nii keskmise kehamasiindeksi ($p = 0,399$) kui keskmise vanuse ($p = 0,594$) poolest. Kõik valitud indiviidide DNA proovid väljastati TÜ EGV biopangast.

Tabel 3. Uuritud valimi kirjeldus: astmaatikute ja kontrollide võrdlus

Kirjeldav tunnus	Kontrollid	Astmaatikud	Kõik
Valimi osa suurus	93	93	186
Mehed	34 (36,6%)	33 (35,5%)	67 (36%)
Naised	59 (63,4%)	60 (64,5%)	119 (64%)
Keskmine vanus	26,7	26,2	26,4
Keskmine KMI	22,6	23,0	22,8
Elukoht maakoht	33 (35%)	30 (32%)	66 (35%)

2.2.2 DNA metülatsiooni andmete eeltöötlus

DNA metülatsiooni erinevuste uurimiseks astmaatikute ja kontrollide vahel olid proovid võetud tsirkuleerivast perifeersest verest ning metülatsiooni tasemed määrati *Illumina HumanMethylation450 BeadChip* metülatsioonikiipi kasutades. Metülatsiooni tase iga CpG saidi korral on leitav metüleeritud proovi intensiivsuse ning metüleeritud ja metüleerimata proovide intensiivsuste summa suhtena. Saadud suurust nimetatakse beeta-väärtuseks (β -väärtus, β -value):

$$\beta = \frac{M}{M + U + \alpha},$$

kus M tähistab metüleeritud proovi intensiivsust, U tähistab metüleerimata proovi intensiivsust ja α on korrektsiooni liige. Illumina on välja pakkunud, et nimetajasse lisada liige α (vaikimisi $\alpha=100$), korrigeerimaks madala signaalitugevusega proove (Du jt., 2010).

Illumina 450K kiibi puhul kasutatakse kahesuguseid erineva disainiga proove metüleeritud ja mittemetüleeritud C nukleotiidide detekteerimiseks. Sellest tingituna on beeta-väärtuste jaotus tüüp I ja tüüp II disaini proovide puhul erinev (Dedeurwaerder jt., 2011), mistõttu on tarvis andmete normaliseerimine. Lisaks sellele on kiibi andmete puhul oluline teostada kvaliteedikontroll, et edasisest analüüsist eemaldada ebaõnnestunud proovid.

Antud bakalaureusetöös kasutatakse kvaliteedikontrolli läbinud ja *Beta-Mixture Quantile Normalisation* (BMIQ, Teschendorff jt., 2012) meetodiga normaliseeritud DNA metülatsiooni beeta-väärtuseid. Lähemalt CpG saitide ja indiviidide kvaliteedikontrolli ning normaliseerimismeetodi valiku kohta saab lugeda Silva Kasela (2013) magistritööst „DNA metülatsioon: normaliseerimine ja analüüs“.

Normaliseerimise käigus kohandatakse indiviidide mõõtmiste tulemusi nii, et väärtused oleks omavahel paremini võrreldavad. Küll aga ei eemalda see segavate faktorite mõju ning ei võta arvesse seda, et veri koosneb paljudest funktsionaalselt ja arenguliselt erinevatest rakkudest, mille proportsioonid ning metülatsiooni mustrid on erinevad (Reininus jt., 2012). Epigeneetilise efekti paremaks kirjeldamiseks (Rakyan jt., 2011) ja valede tulemuste ning järelduste tegemise vältimiseks segavate faktorite olemasolu tõttu (Leek, 2007), korrigeeriti käesoleva töö raames metülatsiooni beeta-väärtusi järgmiste tunnuste suhtes: indiviidi sugu ja

vanus, proovi paigutus kiibile ja positsioon kiibil, kuue suurema vere raku tüübi (CD4, CD8, loomulikud tapjarakud, B-rakud, monotsüüdid, granuotsüüdid) proportsioonide hinnangud veres, mis on leitud Houseman jt (2012) statistilist algoritmi kasutades. Selleks sobitati lineaarse regressiooni mudel iga CpG saidi jaoks, et ennustada beeta-väärtust sõltuvalt segavatest faktoritest. Saadud mudelite jääke ehk tegelike ja ennustatud beeta-väärtuste vahesid nimetame kohandatud beeta-väärtusteks.

Lõpptulemusena on edasises analüüsis kasutada 173 indiviidi, kellest 91 on astmaatikud ja 82 on kontrollid, kohandatud metülatsiooni beeta-väärtused 399 235 CpG saidi kohta. Eemaldatud on indiviidid, kelle proov oli ebakvaliteetne või kelle genotüüp ja metülatsioonimuster ei olnud üksteise kõige paremad vasted. Eemaldatud on saidid, mis asuvad sugukromosoomidel ja/või millest kuni kolme aluspaari kaugusel on SNP ja/või mille DNA metülatsiooni taseme hindamiseks disainitud proovi järjestus ei ole üheselt võimalik vastavusse seada DNA-ahela mingi järjestusega ja/või mis ei ole detekteeritavad (detektsiooni p -väärtus $> 0,01$) rohkem kui 5% indiviidide korral.

2.2.3 Erinevalt metüleeritud regioonide leidmine

Seqlm on Tartu Ülikooli matemaatika-informaatikateaduskonna bioinformaatika teaduri Raivo Kolde ja matemaatilise statistika magistrandi Kaspar Märteni poolt välja töötatud pakett, mille abil on võimalik leida erinevalt metüleeritud regioone ehk DMRe. Antud paketi puhul loetakse DMRiks ka ühe-saidiline erinevus, kui antud CpG saidi läheduses puuduvad teised saidid.

Meetodit on võimalik kasutada vabavaralise statistikaprogrami R paketina ning see on kättesaadav *Githubis* <https://github.com/raivokolde/seqlm>. Seqlm meetod põhineb sellel, et genoom jagatakse väiksemateks osadeks. Kõik moodustatud väiksemad genoomi piirkonnad segmenteeritakse regioonideks, kus võrreldavate gruppide vaheline erinevus on enam-vähem konstantne. Seejärel leitakse see segment, mis kõige paremini kirjeldab andmeid, ja hinnatakse selle olulisust.

Erinevalt metüleeritud regioonide analüüsiks kasutati kohandatud beeta-väärtusi, s.t soo, vanuse, kiibile paigutuse, positsioon kiibil ja kuue suurema vere raku tüübi suhtes korrigeeritud beeta-väärtusi. .

2.2.4 Geeniradade analüüs

Geeniradade analüüs on teostatud *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* programmiga, mille geeni funktsioonide ning bioloogiliste radade andmebaas on kogutud biomeditsiinilisest teaduskirjandusest. Selle abil on võimalik leida seoseid geenide, proteiinide, antud geeniga seotud funktsioonide ning kanooniliste geeniradade vahel.

Geenide ning geeniradade vahelise seose olulisust mõõdeti kahel viisil: (1) suhe, mis leitakse jagades geenide arvu, mis vastavad mingile rajale, kogu molekulide arvuga, mis leidub kanoonilises geenirajas ning (2) Benjamini-Hochbergi mitmese testimise korrigeerimise abil, mis võimaldab arvutada valetestimismäära igale võimalikule väärtusele, et kindlaks teha, kas seos uuritavate geenide ja kanoonilise geeniraja vahel on vaid juhuslik

2.3 Tulemused

2.3.1 Erinevalt metüleeritud regioonid

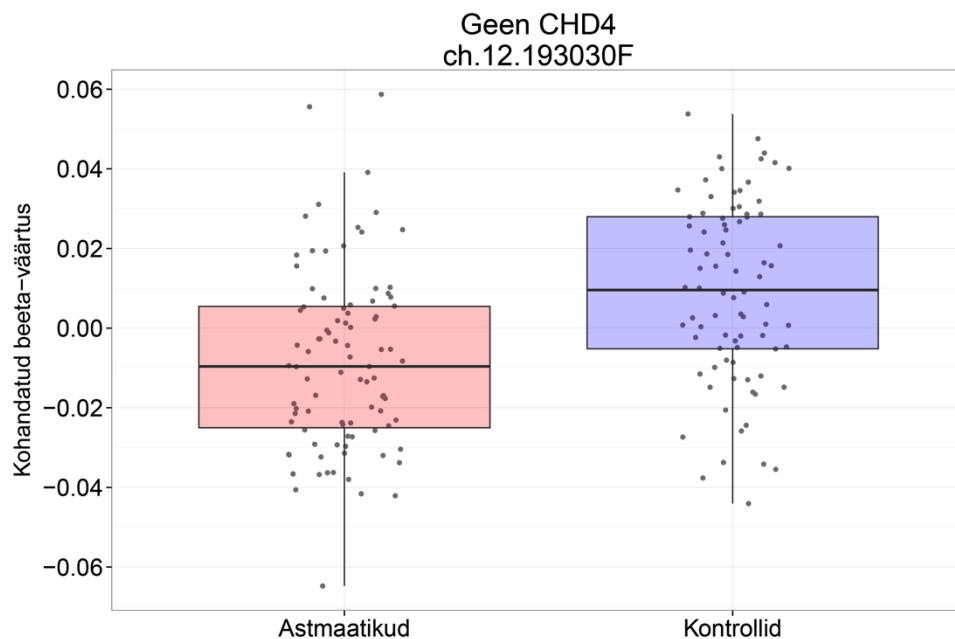
Erinevalt metüleeritud regioonide leidmiseks kasutati 399 206 CpG saiti, mis läbisid kvaliteedi-kontrolli ning mille kohta Illumina annotatsioonifaili kohaselt oli olemas informatsioon asukoha kohta genoomis. Iga CpG saidi korral oli teada selle kohandatud beeta-väärtus, s.t soo, vanuse, kiibile paigutuse, positsioon kiibil ja kuue suurema vere raku tüübi suhtes korrigeeritud beeta-väärtus Võttes arvesse tehtud testide arvu, ei läbinud ükski regioon mitmese testimise korrigeerimise puhul olulisuse piiri ($FDR > 0,05$). P -väärtuse põhjal analüüsi 40 olulisemat regiooni, mis asuvad mingis geenis, on esitatud tabelis 4.

Tabel 4. Olulisemad geenid erinevalt metüleeritud regioonide analüüsil uuritud valimis

CpG sait	Geen	Kromo- soom	Regiooni	Metülat- siooni	Standard- viga	p-väärtus	FDR
ch.12.193030F	<i>CHD4</i>	12	1	0,0175	0,0035	0,000001	0,1908
cg21450318	<i>MLLT1</i>	19	1	0,0052	0,0012	0,000039	0,9996
cg16279290*	<i>SHANK2</i>	11	53	0,0134	0,0032	0,000055	0,9996
cg11881599	<i>CLLU10S</i>	12	1	0,0157	0,004	0,000136	0,9996
cg02319016	<i>PAK2</i>	3	1	0,0146	0,0038	0,000143	0,9996
cg20263733	<i>ATP2C1</i>	3	1	0,0112	0,0029	0,000159	0,9996
cg07395000*	<i>TECPR1</i>	7	19	-0,0031	0,0008	0,000177	0,9996
cg07209977	<i>KIAA1026</i>	1	1	0,0101	0,0026	0,000178	0,9996
cg08105265*	<i>EPX</i>	17	118	0,0095	0,0025	0,000208	0,9996
cg18537383	<i>MCPH1</i>	8	1	0,0109	0,0029	0,000212	0,9996
cg04468092	<i>LGI2</i>	4	1	0,0107	0,0028	0,000225	0,9996
cg10103235	<i>RPIA</i>	2	1	-0,0083	0,0022	0,000248	0,9996
cg19124300	<i>PCCB</i>	3	1	0,0199	0,0053	0,000254	0,9996
cg27469152	<i>EPX</i>	17	1	0,0149	0,004	0,000270	0,9996
cg10451724*	<i>PLEC1</i>	8	207	-0,0032	0,0009	0,000276	0,9996
cg00076936*	<i>C20orf118</i>	20	529	0,0092	0,0025	0,000284	0,9996
cg16118491	<i>TRAPPC9</i>	8	1	0,0091	0,0025	0,000286	0,9996
cg19725098	<i>ACACA</i>	17	1	0,0064	0,0017	0,000288	0,9996
cg04070427	<i>CEP250</i>	20	1	-0,0058	0,0016	0,000290	0,9996
cg11491436*	<i>MAPK10</i>	4	978	-0,0119	0,0032	0,000292	0,9996
cg07099567	<i>STON2</i>	14	1	-0,0151	0,0041	0,000299	0,9996
cg24520885	<i>MYST4</i>	10	1	0,0165	0,0045	0,000307	0,9996
cg09556351	<i>PBLD</i>	10	1	-0,0131	0,0036	0,000313	0,9996
cg16692439	<i>ASPHD2</i>	22	1	0,0128	0,0035	0,000323	0,9996
cg07572223	<i>TTC18</i>	10	1	-0,0077	0,0021	0,000338	0,9996
cg25173129*	<i>EPX</i>	17	409	0,0105	0,0029	0,000342	0,9996
cg21220721*	<i>ACOT7</i>	1	98	0,0189	0,0052	0,000350	0,9996
cg27109907	<i>WWOX</i>	16	1	-0,0077	0,0021	0,000356	0,9996
cg07915516	<i>AXIN1</i>	16	1	0,0165	0,0045	0,000359	0,9996
cg17170839*	<i>GPM6A</i>	4	558	0,016	0,0044	0,000398	0,9996
cg03729337*	<i>PRDM6</i>	5	659	0,0051	0,0014	0,000413	0,9996
cg02246876*	<i>CEBPE</i>	14	2035	0,0044	0,0012	0,000421	0,9996
cg13645296*	<i>DAPK2</i>	15	44	0,0126	0,0035	0,000439	0,9996
cg05184016*	<i>ZNF862</i>	7	42	0,0135	0,0038	0,000462	0,9996
cg23712522*	<i>KIAA1688</i>	8	415	0,0063	0,0018	0,000464	0,9996
cg06972908	<i>ITGAL</i>	16	1	0,0121	0,0034	0,000483	0,9996
cg18438345*	<i>TSP02</i>	6	911	0,0057	0,0016	0,000501	0,9996
cg12986327*	<i>PTH2</i>	19	379	0,0069	0,002	0,000513	0,9996
cg26787239*	<i>IL4</i>	5	828	0,008	0,0023	0,000513	0,9996
cg01112801	<i>CCT8</i>	21	1	-0,0234	0,0066	0,000519	0,9996

* Erineval metüleeritud regiooni esimene CpG sait, kõik CpG saidid on toodud tabelis Lisa 1.

Kõige suurem erinevus astmaatikute ja kontrollide metülatsioonimustrites on 12. kromosoomis geenis *CHD4* asuva CpG saidi ch.12.193030F korral. Antud CpG saidi keskmine metülatsiooni beeta-väärtus on 0.169 (st. hälve = 0.033) astmaatikute ja 0.188 (st. hälve = 0.033) kontrollide puhul. Kontrollide keskmine metülatsioonitase on 0,0175 ($p = 9,67 \cdot 10^{-7}$, FDR = 019) võrra kõrgem kui astmaatikutel. Erinevus ei osutunud küll statistiliselt oluliseks, kuid võib viidata tendentsile, et kontrollide puhul on metülatsiooni tase antud CpG saidi puhul keskmiselt kõrgem kui astmaatikutel, mida on näha ka joonisel 5 olevalt karpdiagrammilt.



Joonis 5. Geeni *CHD4* kohandatud beeta-väärtused astmaatikutel ja kontrollidel uuritud valimis

Kuna ülegenoomsel analüüsil oli testide arv niivõrd suur, et ühegi CpG saidi metülatsiooni erinevus ei osutunud oluliseks pärast mitmese testimise korrigeerimist, otsustati järgnevalt vaadelda eraldi ka varem raporteeritud astmaga seotud gene, et välja selgitada, kas esineb olulisi metülatsiooni erinevusi uuritavas valimis. Seega tehti samasugune analüüs ka geenidele, mida on erialases kirjanduses astmaga seostatud (vt Lisa 2. tabel). Tabelis 5. on toodud analüüsi 20 väikseima korrigeerimata p -väärtusega regiooni, mis asuvad mingis geenis.

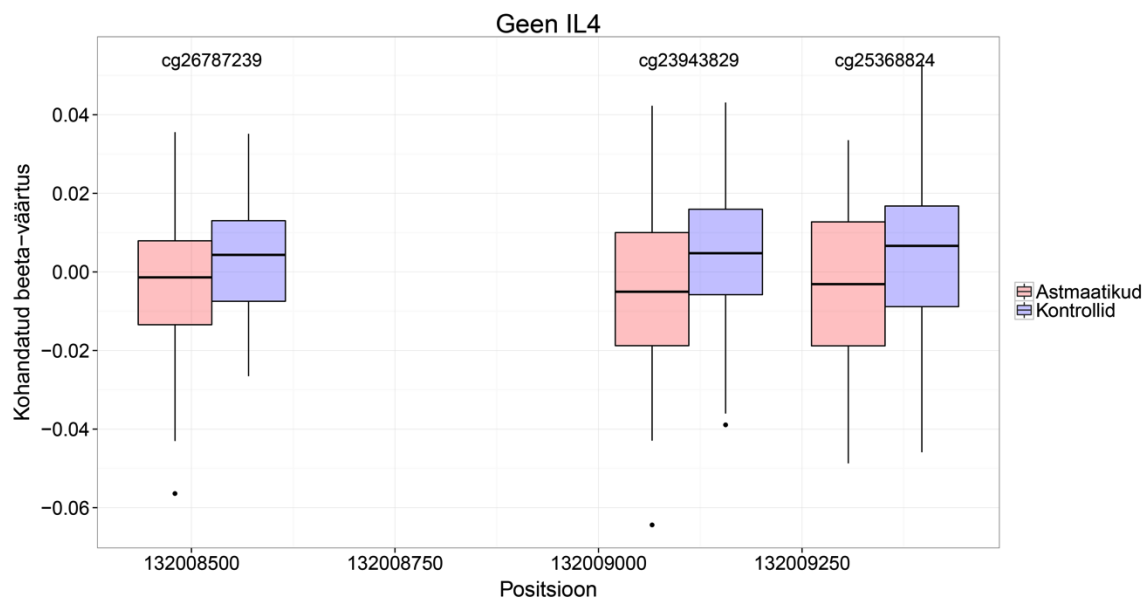
Tabel 5. Olulisemad geenid erinevalt metüleeritud regioonide analüüsil kandidaatgeenide põhjal uuritud valimis

CpG sait	Geeninimi	Kromo- soom	Regiooni laius	Metülatsiooni erinevuse kordaja	Standardviga	<i>p</i> -väärtus	FDR
cg26787239*	<i>IL4</i>	5	828	0,007969	0,002	0,0005	0,387
cg01815645	<i>HLA-DRB1</i>	6	1	-0,02382	0,007	0,0015	0,5775
cg18897025	<i>TSLP</i>	5	1	-0,01288	0,004	0,0034	0,5998
cg17738684*	<i>IL1RL1</i>	2	621	0,007431	0,003	0,0039	0,5998
cg25464787*	<i>PYHIN1</i>	1	696	-0,00543	0,002	0,004	0,5998
cg01550445	<i>P2RY2</i>	11	1	0,009782	0,004	0,0109	0,9989
cg27301649	<i>COL29A1</i>	3	1	-0,00834	0,004	0,0148	0,9989
cg17159093*	<i>SPATS2L</i>	2	93	0,003632	0,002	0,0154	0,9989
cg06226703	<i>SPATS2L</i>	2	1	0,006032	0,003	0,0158	0,9989
cg16287734	<i>P2RY2</i>	11	1	0,00832	0,004	0,0172	0,9989
cg22012693	<i>COL22A1</i>	8	1	0,006715	0,003	0,0183	0,9989
cg11303839	<i>CCL26</i>	7	1	0,017973	0,008	0,0199	0,9989
cg01068906*	<i>NOD2</i>	16	120	-0,00421	0,002	0,0203	0,9989
cg13855852	<i>IL2RA</i>	10	1	0,004339	0,002	0,0214	0,9989
cg06584121*	<i>IL13</i>	5	36	0,005506	0,003	0,0223	0,9989
cg01200186	<i>PRKG1</i>	10	1	-0,00571	0,003	0,0244	0,9989
cg25330422	<i>STAT3</i>	17	1	0,009762	0,004	0,0246	0,9989
cg19025272	<i>SPATS2L</i>	2	1	0,006167	0,003	0,0306	0,9989
cg11926456	<i>CPS1</i>	2	1	0,010191	0,005	0,0328	0,9989
cg03669298	<i>GATA3</i>	10	374	0,003214	0,002	0,0333	0,9989

* Erineval metüleeritud regiooni esimene CpG sait, kõik CpG saidid on toodud tabelis Lisa 3.

Ka kandidaatgeenide analüüsi tulemustest selgus, et ükski geen ei läbinud mitmese testimise korrigeerimise puhul olulisuse piiri.

Kuid vaadeldes eraldi kõige madalama *p*-väärtusega geeni interleukiin-4 (*IL4*), on võimalik näha muutust DNA metülatsioonis kolme järjestikuse saidi puhul (joonis 6.). Kõigi kolme CpG saidi puhul on kohandatud beeta-väärtuste mediaan astmaatikutel veidi madalam kui kontrollidel. Tulemus ei osutunud küll statistiliselt oluliseks pärast mitmese testimise korrigeerimist, kuid võib jällegi viidata teatud tendentsile.



Joonis 6. Geeni IL4 kohandatud beeta-väärtused kolmes järjestikuses CpG saidis astmaatikutel ja kontrollidel

2.3.2 Geeniradade analüüs

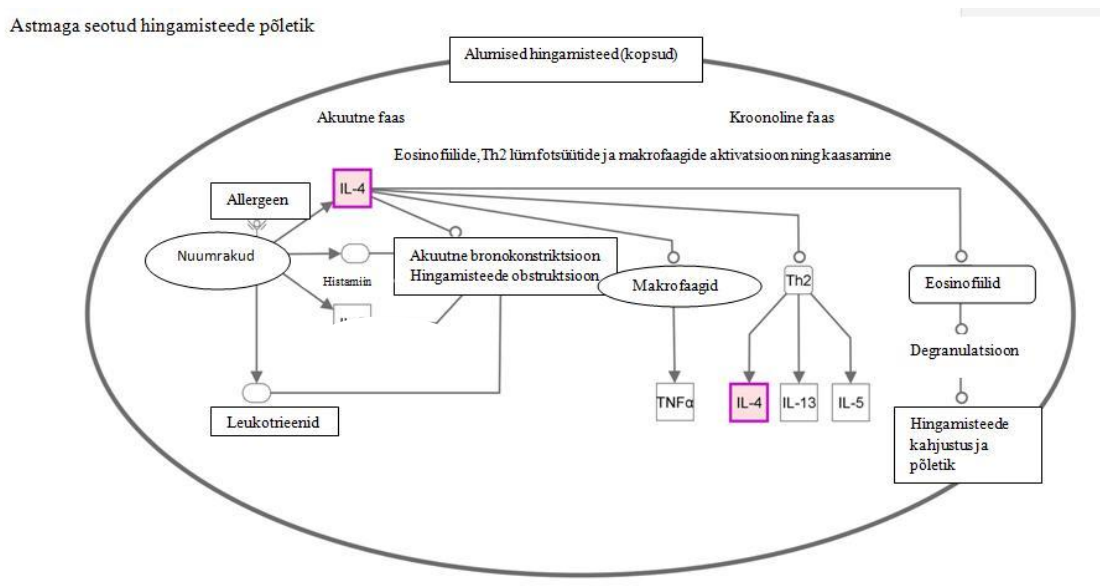
Kuna erinevalt metüleeritud regioonide analüüsi põhjal ilmnemise siiski mõningased erinevused (ehkki mitte statistiliselt olulised pärast mitmese testimise korrigeerimist) metülatsioonimustrites astmaga indiviidide ning kontrollide vahel, otsustati järgnevalt uurida, kas valimi põhjal testitud diferentsiaalselt metüleeritud regioonidega seotud geenid kuuluvad mõnda astmaga seotud bioloogilisse rajas. Täpsemalt kasutati eelnevalt erinevalt metüleeritud regioonide analüüsi abil leitud erinevustega seotud gene, mille korrigeerimata p -väärtus oli väiksem kui 0,001 (vt Lisa 1 tabel). Analüüsiks üles laetud geenidest leidsid *Ingenuity pathways* andmebaasist vaste 74 geeni, viis geeni olid kaardistamata ning neid analüüsi ei kaasatud.

Analüüsist selgus, et sisestatud geenid olid kõige enam esindatud funktsionaalsetes radades, mis on seotud ülitundlikkuse vastuse ning põletikulise vastuse kujunemisega. Tabelis 6 on välja toodud geenid, mis olid valimi põhjal sisestatud geenidest diferentsiaalselt metüleeritud ja nendega seotud funktsionaalsed rajad.

Tabel 6. Üle-esindatud funktsionaalsed rajad valmi põhjal leitud erinevalt metüleeritud regioonidega geenide alusel

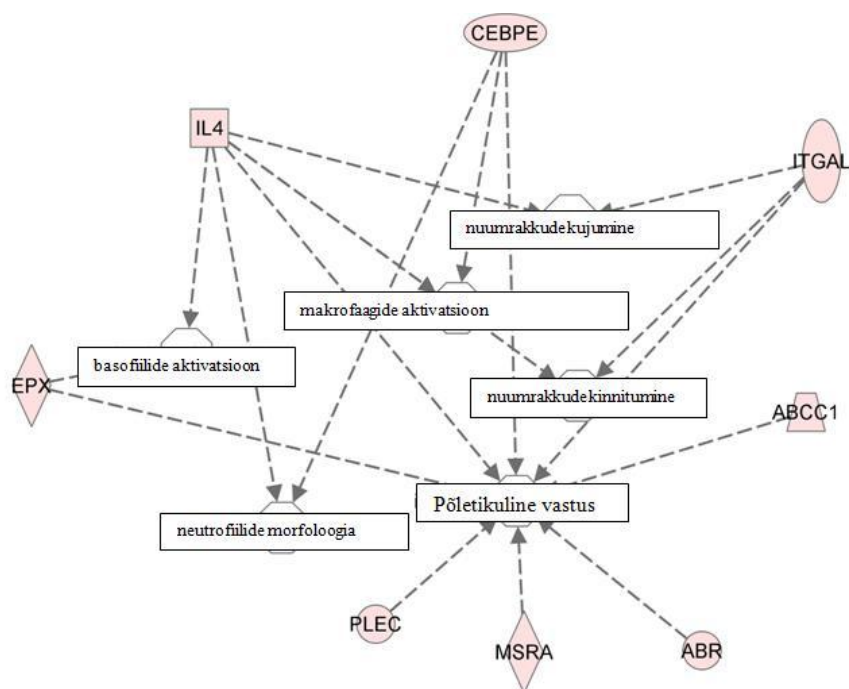
Funktsioon	<i>p</i> -väärtuste vahemik	Geen
Ülitundlikkuse vastus	0,000165 – 0,02	<i>ABCC1</i> , <i>EPX</i> , <i>ITGAL</i> , <i>CEBPE</i> , <i>IL4</i>
Põletikuline vastus	0,000165 – 0,0265	<i>PAK2</i> , <i>ABR</i> , <i>ABCC1</i> , <i>EPX</i> , <i>MAPK10</i> , <i>PLEC</i> , <i>ZFPM1</i> , <i>MSRA</i> , <i>TECPRI</i> , <i>ITGAL</i> , <i>CEBPE</i> , <i>IL4</i>

Oluliselt esindatud funktsionaalsetes radades paistab silma geen interleukiin-4 (*IL4*). *IL4* oli pärast mitmese testimise korrektsiooni olulisima 40 geeni seas ka mõlemas erinevalt metüleeritud regioonide analüüsis nii valimi põhjal kui kandidaatgeenide alusel (tabel 4 ja tabel 5.). *Ingenuity* geeniradade analüüsi tulemusel ilmnes, et geen *IL4* osaleb olulistes astmaga seotud funktsionaalsetes radades, eelkõige astmaga seotud hingamisteede põletiku kujunemisel (joonis 7.).



Joonis 7. Geeni *IL4* roll astmaga seotud hingamisteede põletikulistes radades.

Lisaks geenile *IL4* olid ülitundlikkuse ja põletiku vastusega seotud geenide seas olulised ka sisestatud geenid *CEBPE*, *ITGAL*, *EPX*, *PLEC*, *ABCC1*, *MSRA*, *ABR* (joonis 8.). Ka nimetatud geenid mõjutavad *Ingenuity* andmebaasi alusel erinevate põletikuga seotud rakkude funktsioone ning seeläbi ka põletikulist vastust.



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Joonis 8. Võrgustik differentiaalselt metüleeritud geenidest põletikulise vastusega seotud funktsionaalses rajas

2.4 Arutelu

Erinevalt metüleeritud regioonide analüüsist ilmneseid mõningased erinevused astmaatikut ja kontrollide vahel, kuid need ei osutunud oluliseks pärast mitmese testimise korrigeerimist. Valimi põhjal leitud erinevalt metüleeritud regioonide olulisima p -väärtusega geen oli *CHD4*. *CHD4* CpG sait ch.12.193030F metülatsiooni erinevuse kordaja oli 0,0175, korrigeerimata p -väärtus oli $9,67 \cdot 10^{-7}$ ning valeavastusmäär mitmese testimise korrigeerimisel (FDR) 0,1908.

Ka erialases kirjanduses on seostatud *CHD4* geeni astmaga. Hosokawa ja kolleegid raporteerisid 2013. aasta artiklis, et antud geeni kodeeritud DNAd siduv valk CHD4 moodustab GATA3 transkriptsiooni faktoriga kompleksi Th2 rakkudes. Nimetatud kompleks omakorda aktiveerib Th2 tsütokiinide transkriptsiooni. Lisaks kirjeldasid autorid ka *CHD4* geeni füsioloogilist rolli, näidates, et antud geen omab tähtsust Th2 rakkude vahendatud põletiku ning hingamisteede hüperreaktiivsuse tekkes allergilise astma korral *in vivo* mudeli alusel (Hosokawa jt., 2013). Kuigi käesoleva uurimistöö valimisse olid kaasatud astmaatikud, kellel raporteeriti mitteallergiline astma ning kes olid mittesuitsetajad, võivad viidata saadud

tulemused samuti *CHD4* geeni ning sellega seotud funktsionaalsete radade võimalikule rollile Th2 rakkudes astma korral.

Mõlema erinevalt metüleeritud regioonide analüüsi põhjal ilmnes mõningane erinevus geeni *IL4* kolmes järejestikus CpG saidis astmaatikute ja kontrollide vahel. Metülatsiooni erinevuse kordaja CpG saitide cg26787239, cg23943829 ja cg25368824 puhul oli 0,008, korrigeerimata *p*-väärtus 0,0005 ja FDR 0,387. Kuigi erinevus ei osutunud pärast mitmese testimise korrigeerimise statistiliselt oluliseks, on erialasest kirjandusest võimalik leida mitmeid artikleid, mis seostavad geeni *IL4* astmaga. Juba 1994. aastal näitasid Brüsselle ja kolleegid *in vivo* mudelis, et interleukiin-4 on keskne mediaator allergilise hingamisteede põletiku tekkimisel (Brüsselle jt., 1994). Zhang ning kolleegid näitasid geeni *IL4* ning teiste Th2 raja immuunvastusega seotud geenide (*IL13*, *GATA3*, *STAT6*) metülatsiooni seost astma riski kujunemisega. Analüüsid teostati perifeersest verest võetud proovide põhjal populatsioonipõhises tütarlaste kohordis. Autorid leidsid, et metülatsiooni kõrgem tase saidis cg23943829 võib olla astma riski vähendav modifikatsioon (Zhang jt., 2014). Käesoleva töö raames läbi viidud *Ingenuity* analüüsil ilmnes, et geen *IL4* oli oluline nii ülitundlikkuse kui ka põletikulise vastusega seotud funktsionaalses rajas. Nende tulemusi kinnitavad veel Peters ja kolleegid, kes seostasid bronhisekreedist võetud analüüside põhjal interleukiin-4 ekspressiooni Tüüp-2 tsütokiini kõrge tasemega astma fenotüübiga (*Th2 high phenotype*) ning raskema kuluga astmaga ja halvema reageerivusega tavaravile (Peters jt., 2014). Antud töös identifitseeritud *IL4* geeni DMRI sees oli ka esindatud Zhang jt CpG sait cg23943829 ja nägime sarnaselt eelnevatele autoritele keskmiselt kõrgemaid metülatsiooniväärtusi kontrollide grupis.

Tulemuste analüüsimisel on oluline asjaolu, et lisaks tehnilistele faktorite kompleksusele (andmete normaliseerimise, korrigeerimise ja statistilise analüüsiga seonduv) tuleb võtta arvesse, et perifeerne veri ei pruugi olla kõige parem kude metülatsioonimustrite erinevuste hindamiseks astma korral. Osad autorid on hinnanud DNA metülatsiooni muutusi näiteks hingamisteede epiteelirakkudes (Kim jt., 2013), perifeerse vere monotsüütides (Stefanowicz jt., 2012; Martino jt., 2012; Naumova jt., 2013), T lümfotsüütides (Runyon jt., 2012) ning nabaveeni verest pärit monotsüütidest (Martino jt., 2012). Samas hiljutise uuringu põhjal leiti, et enamus geene, mida seostatakse kopsu funktsiooniga, olid ekspresseeritud ka perifeerse vere rakkudes, ehkki mõõdukalt tasemel (Soler, 2011). Kuigi astma korral leitud DNA metülatsiooni erinevused on küllaltki väikesed, mistõttu tulemuste interpreteerimine on keeruline, arvatakse, et teatud CpG saitide regulatoorsed omadused võivad olla vahendatud

nn. lävendi-efekti kaudu (DeVries jt, 2013). Arvatakse, et väikesed kvantitatiivsed erinevused DNA metülatsioonis võivad põhjustada suuremaid kvalitatiivseid muutusi seotud funktsionaalsetes radades (DeVries jt, 2013).

Oluline on ka arvestada erinevate vere rakutüüpide metülatsioonimustritega, mis „lahjenevad“ kogu vere analüüsil. On väga tõenäoline, et käesolevas töös leitud metülatsioonierinevuste tendentsid pärinevad tegelikult mõnest funktsionaalsest rakutüübist (nt basofiilid või nuumrakud) ning kui analüüsida samade geenide metülatsioonimustreid puhastatud immuunrakkudes, võivad tulemused osutuda statistiliselt olulisteks. Paljudes uuringutes aga pole erinevate rakutüüpide puhastamine võimalik, nt kui proovid on varasemalt kogutud, või puuduvad vastavad ressursid, ja sellisel juhul võib suurema võimsuse väikeste efektide avastamiseks tagada suurema valimi analüüsimine.

Erialases kirjanduses tekitab küsimusi ka metülatsiooni erinevustega seotud tulemuste tõlgendamine. Siinkohal on abiks järjest täienevad bioinformaatilised meetodid (*Ingenuity* jt), mis võimaldavad erinevate epigeneetiliste muutuste seostamist funktsionaalsete radade ja patogeneesi mehhanismidega (DeVries jt, 2013). Antud töös oli samuti abiks geenifunktsioonide uurimine, mis aitas järeldada, et kuigi astmaatikute ja kontrollide DNA metülatsioonimustrite vahel ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi pärast mitmese testimise korrigeerimist, siis kõige madalama korrigeerimata p -väärtusega ($p < 0,0001$) geenide seas olid üle-esindatud põletiku ja ülitundlikkuse vastusega seotud funktsioonid. Selline tulemus annab kindlust juurde, et antud geene tasub lähemalt uurida kas suuremas kohordis või puhastatud immuunrakkudes.

KOKKUVÕTE

Astma on krooniline hingamisteede põletikuline komplekshaigus, millesse haigestunud indiviidide arv üha kasvab. Viimase paarikümne aasta jooksul on erinevate uuringute tulemusena avastatud üle 100 erineva astmaga seotud geeni, kuid on veel palju, mida haiguse kohta ei teata. Kindlaks on tehtud, et vastuvõtlikkus astmale ning haiguse raskusaste sõltub oluliselt keskkonnafaktorite ning geenide vastatikuusest mõjust. Keskkonna mõjutegurid arvatakse olevat vahendatud epigeneetiliselt. Põhiliseks uuritud epigeneetiliseks modifikatsiooniks on DNA metülatsioon. Täpsemalt on astmaga seotud muutuste uurimiseks võimalik tuvastada erinevalt metüleeritud regioone, milleks on metülatsiooni erinevused mitmes järjestikuses metülatsioonisaidis.

Käesoleva töö analüüsiks kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidonorite andmeid ning valimisse kaasati 93 astmaatikut ning 93 kontrollindiviidi. Uuritavatelt olid võetud proovid perifeersest verest, millest mõõdeti DNA metülatsiooni taset, kasutades Illumina 450K metülatsiooni kiipi. Töö praktilise osa eesmärgiks oli esmalt leida DNA metülatsiooni regionaalseid muutusi, mis on seotud astma esinemisega, ning seejärel teostada leitud muutustega seotud geenide funktsionaalne analüüs.

Selleks, et uuring oleks piisava võimsusega, viidi esimese sammuna läbi soovimatute variatsioonide eemaldamine. Selle käigus kohandati metülatsiooni mõõtmisel saadud normaliseeritud beeta-väärtuste andmed indiviidi soo ja vanuse, proovi paigutuse kiibile ja positsiooni kiibil ning kuue olulisema vere raku tüübi suhtes.

Järgnevalt viidi läbi erinevalt metüleeritud regioonide analüüs, kasutades kohandatud beeta-väärtusi ja R paketti SeqM. Ühegi metülatsiooni muutustega seotud regiooni tulemused pärast mitmese testimise korrektsiooni statistilise olulisuse piiri ei ületanud. Seetõttu otsustati uuritavas valimis keskenduda 118 geenile, mida on eelnevalt erialases kirjanduses astmaga seostatud. Ka selle analüüsi tulemusel saadud metülatsiooni regionaalsed erinevused ei ületanud statistilise olulisuse piiri pärast mitmese testimise korrektsiooni.

Viimaks analüüsiti kõige olulisemate metülatsiooni erinevustega seotud geenide funktsioone ning bioloogilisi radasid (*Ingenuity Pathway Analysis*), mille tulemusena selgus, et antud geenide funktsioonide seas on üle-esindatud ülitundlikkuse ning põletikuline vastus, mis on astmaga otseselt seotud funktsionaalsed rajad. Lisaks sellele, ilmnes, et analüüsitud valimis kõige olulisemate muutustega geenid *CHD4* (ülegenoomsest analüüsist) ja *IL4* (kandidaatgeeni uuringust), on ka varasemalt kirjanduses astmaga seostatud.

Tulevikus oleks huvipakkuv uurida astmaga seotud DNA metülatiooni muutusi suuremas kohordis ning võimaluse korral kasutada proove, mis on saadud mõnest vähem kompleksest koest kui perifeerne veri. Lisaks oleks huvitav siduda teiste kõige olulisemalt differentiaalselt metüleeritud geenide seoseid keskkonna faktoritega, nagu näiteks füüsiline aktiivsus, maal või linnas elamine jm astmaga seotud võimalikud keskkondlikud tegurid.

SUMMARY

Asthma associated DNA methylation changes in peripheral blood Carmen-Kristiina Parik

Asthma is a chronic complex inflammatory respiratory disease, the prevalence of which is increasing. During last decades different studies have demonstrated more than one hundred genes related to asthma but the exact relationship between genetic and environmental factor is not yet fully understood. The interest in asthma epigenetic is high because epigenetic mechanisms are likely to contribute to the environmental origins of the disease and its phenotypic variability. DNA methylation, particularly differentially methylated regions, has been the main epigenetic modification studied in asthma.

In the current study data from 93 asthma patients and 93 controls from the Estonian Genome Center, University of Tartu were analyzed. Peripheral blood samples were collected and DNA methylation was analyzed by using Illumina *Infinium HumanMethylation450 BeadChip*. The objective of the experimental part of the study was to identify differentially methylated DNA regions (DMR) related to asthma and to link these findings to functional pathways.

Firstly, to enhance the power of the study the removal of known confounders was carried out. The beta-values that were obtained from DNA methylation assessment were adjusted for gender, age, location and position on the chip and six major cells types in peripheral blood. Thereafter, analysis of DMR by SeqIm was performed using adjusted beta-values. None of the beta-values of the DMRs retained the statistical significance in asthmatics versus controls after multiplicity correction in statistical analysis. Therefore, additional analysis was performed to explore the possible relationships between the identified DMRs in study sample with already documented 118 genes related to asthma based on scientific literature. Again, the results of the analysis did not retain statistical significance based on the multiplicity correction.

Lastly, evaluation of the functions and biological pathways of the identified genes associated with the DMRs was performed using *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). The results showed that the inflammatory response and hypersensitivity response pathways were activated in studied asthmatics. In addition, the identified genes with most important DMR modifications

(CHD4 based on EWAS and IL4 based on candidate gene analysis) in the current study have been implicated in asthma based on scientific literature.

For future research it would be interesting to explore DNA methylation patterns in a bigger asthma cohort and to use samples derived from less complex tissue than peripheral blood. Also, it might be of interest to study associations between the genes with DMRs and behavioral and environmental characteristics such as physical activity, residence in rural or in urban areas and others

TÄNUAVALDUSED

Autor tänab Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramut töös kasutatud geenidoonorite andmete kasutamise eest, kõiki geenidoonoreid ning töö juhendajaid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu vanemteadur Lili Milanit ja Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia, loodus- ja tehnoloogiateaduskonna doktoranti Silva Kaselat täienduste, nõuannete ning igakülgse abi eest.

Autor tänab ka oma lähedasi toetuse ning innustuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008; 322: 881–88.
- Astma ravi ja ennetamise lühiversioon; põhineb astma ravi ja ennetamise ülemaaailmsel strateegial. 2006
- Baccarelli A, Rusconi F, Bollati V, Catelan D, Accetta G, Hou L, ja teised. Nasal cell DNA methylation, inflammation, lung function and wheezing in children with asthma. *Epigenomics*. 2012;4:91-100.
- Barlow, D. P. Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu. Rev. Genet* 45, 379-403.
- Bestor, T. H. The host defence function of genomic methylation patterns. *Novartis Found. Symp.* 214, 187-199
- Bibikova M, B. Barnes, C. Tsan, ja teised. 2011. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 98: 288-295.
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–8
- Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet.* 2012 Oct;13(10):705-19. doi: 10.1038/nrg3273. Review.
- Breton CV, Byun HM, Wang X, Salam MT, Siegmund K, Gilliland FD. DNA methylation in the arginase-nitric oxide synthase pathway is associated with exhaled nitric oxide in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:191-7.
- Brusselle, G. G., Kips, J. C., Tavernier, J., Van Der Heyden, J. G., Cuvelier, C. A., Pauwels, R. A. and Bluethmann, H., Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin. Exp. Allergy* 1994. 24: 73–80.
- Busse WW, Lemenske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344(5):350-62
- Calışkan M, Bochkov YA, Kreiner-Moller E, et al. Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma. *N Engl J Med* 2013; 368: 1398–407.
- Charpin D, Bimbaum J, Haddi E, Genard G, Lanteaume A, Toumi M, et al. Altitude and allergy to house-dust mites. A paradigm of the influence of environmental exposure on allergen sensitization. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143(5 Pt 1): 983-6.
- Chaudhuri R, Livingstone E, McMahon AD, Lafferty J, Fraser I, Spears M, McSharry CP, Thomson NC. Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Jul 15; 174(2): 127-33.
- Chen LL, Tager IB, Peden DB, Christian DL, Ferrando RE, Welch BS, et al. Effect of ozone exposure on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Chest* 2004; 125(6): 2328-35.
- Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:789.
- Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ et al (2012) Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet* 131:1565–89
- Cromheecke JL, Nguyen KT, Huston DP. Emerging Role of human Basophil Biology in Health and Disease. *Curr Allergy Asthma Res* 2014 14:408
- Deaton AM, Bird A CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011; 25: 1010–1022.
- Dedeurwaerder, S., M. Defrance, E. Calonne, ja teised. 2011. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. *Epigenomics* 3: 771–784.
- Devries A, Vercelli D. Epigenetics of human asthma and allergy: promises to keep. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013 Sep;31(3):183-9.
- Du P., X. Zhang, C. C. Huang, ja teised. 2010. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 11: 587.

- Dumas O, Laurent E, Bousquet J, Metspalu A, Milani L, Kauffmann F, Le Moual N. Occupational irritants and asthma: an Estonian cross-sectional study of 34 000 adults. *Eur Respir J*. 2014 Apr 17.
- Ege MJ, Herzum I, Buchele G, et al. Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:407–412; 12 e1–12 e4.
- Ege MJ, Strachan DP, Cookson WO, et al, and the GABRIELA Study Group. Gene–environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in Central Europe. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 138–44, e1–4.
- Ford ES. The Epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(5):897–909.
- Frigola J., J. Song, C. Stirzaker, ja teised. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nature Genetics* 2006; 38: 540–549.
- Frommer, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 1827–1831 (1992).
- Fu A, Leaderer BP, Gent JF, Leaderer D, Zhu Y. An environmental epigenetic study of ADRB2 5'-UTR methylation and childhood asthma severity. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:1575–81.
- Galli SJ, Kalensnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as „tunable“ effectors and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 749–86.
- Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 2004; 351(11): 1057.
- Grunberg K, Sterk PJ. Rhinovirus infection: induction and modulation of airways inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29 Suppl 2:65–73S
- Heinaru, A. 2012. *Geneetika*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(6):1139–46
- Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;(29)(8):1023–32.
- Hosokawa H, Tanaka T, Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y, Onodera A, Tumes DJ, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 19;110(12):4691–6.
- Houseman, A. E., W. P. Accomando, D. C. Koestler, ja teised. 2012. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics* 13: 86.
- Huss K, Adkinson NF, Jr., Eggleston PA, Dawson C, Van Natta ML, Hamilton RG. House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(1): 48–54.
- Isidoro-Garcia M, Sanz C, Garcia-Solaesa V, Pascual M, Pescador DB, Lorente F, et al. PTGDR gene in asthma: a functional, genetic, and epigenetic study. *Allergy*. 2011;66:1553–62.
- Jaffe, A. E., P. Murakami, H. Lee, ja teised. 2012. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *International Journal of Epidemiology* 41: 200–209.
- Janson C, Chinn S, Jarvis D, Burney P. Physician-diagnosed asthma and drug utilization in the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1997;10:1795–802.
- Jeltsch, A. 2006. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 301, 203–25.

- Joubert BR, Haberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy.
- Juge-Aubry C, Henrichot E, Meier C. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(4): 547-66
- Jõgi, R. 2005 Kas astma on Eestis üle- või aladiagnoositud? *Eesti Arst* 2005; 84 (3): 163-167
- Kabesch M. Epigenetics in asthma and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;14(1):62-8.
- Kasela S. DNA metülatsoon: normaliseerimine ja analüüs. 2013
- Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol* 2004; 25(9): 477
- Kim YJ, Park SW, Kim TH, Park JS, Cheong HS, Shin HD, et al. Genome-wide methylation profiling of the bronchial mucosa of asthmatics: relationship to atopy. *BMC medical genetics*. 2013;14:39.
- Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology in asthma. *Front Microbiol* 2013 10:4: 263
- Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(6); 702-8.
- Laitinen T, Rasanen M, Kaprio J, Koskenvuo M, Laitinen LA (1998) Importance of genetic factors in adolescent asthma: a population-based twin-family study. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1073–1078
- Lambrecht BN, Hammad H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity. *Eur J Immunol*. 2013 Dec;43(12):3125-37
- Lampi J, Canoy D, Jarvis D, et al. Farming environment and prevalence of atopy at age 31: prospective birth cohort study in Finland. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:987–993.
- Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(3): 450-63.
- Latzin P. Air pollution and asthma in childhood. *Ther Umsch*. 2013 Dec;70(12):708-13
- Leek, J. T., ja J. D. Storey. 2007. Capturing Heterogeneity in Gene Expression Studies by Surrogate Variable Analysis. *PloS Genetics* 3: e161.
- Lemiere C, Ameille J, Boschetto P, et al. Occupational asthma: new deleterious agents at the workplace. *Clin Chest Med* 2012; 33: 519–530.
- Li X, Ampleford EJ, Howard TD, et al. Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130: 861–68, e7.
- MacArthur, D. 2008. Why do genome-wide scans fail? *Genetic Future*. <http://www.wired.com/wiredscience/2008/09/why-do-genome-wide-scans-fail/>
- Maksimovic, J., L. Gordon, ja A. Oshlack. 2012. SWAN: Subset-quantile Within Array Normalization for Illumina, Inc; Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biology* 13: R44.
- Malo JL, Chan-Yeung M, Asthma in the workplace. *Can Respir J*. 2007 Oct;14(7):407-13. Review. No abstract available.
- Malo JL, Lemiere C, Gautrin D, Labrecque M. Occupational asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2004; 10(1): 57-61.
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bembien L.A., Berka J., et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437:376–380.
- Martin, M & Herceg, Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. *Genome Med*. 2012; 4, 8.
- Martinez Fd, Wright AL, Taussing LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332(3): 133-8

- Martino D, Maksimovic J, Joo JH, et al. Genome-scale profiling reveals a subset of genes regulated by DNA methylation that program somatic T-cell phenotypes in humans. *Genes Immun* 2012; 13:388–398.
- Masoli, Matthew; Fabian, Denise; Holt, Shaun; Beasley, Richard; Global Initiative for Asthma (GINA) Program The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2012 59(5):469-78
- Mathias RA; Introduction to Genetics and Genomics in Asthma: Genetics of Asthma.Chapter 9 In Heterogeneity in Asthma 2014 ; 128
- McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 356–69.
- Meissner, A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nature Biotech.* 2010; 28, 1079-1088.
- Metzker M.L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31–46. doi: 10.1038/nrg2626
- Meyers DA, Bleecker ER, Holloway JW, Holgate ST.Asthma genetics and personalised medicine. *Lancet Respir Med.* 2014 May;2(5):405-415
- Michel S, Busato F, Genuneit J, Pekkanen J, Dalphin JC, Riedler J, et al. Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy*. 2013;68:355-64.
- Michels KB, Binder AM, Dedeurwaerder S, Epstein CB, Greally JM, Gut I, Houseman EA, Izzi B, Kelsey KT, Meissner A, Milosavljevic A, Siegmund KD, Bock C, Irizarry RA. Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods.* 2013 Oct;10(10):949-55.
- Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al, for the GABRIEL Consortium. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010; 363: 1211–21.
- Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 2007; 448: 470–73.
- Montuschi P, Barnes PJ New perspectives in pharmacological treatment of mild persistent asthma. *Drug Discov Today* 2001; 16:1084–1091
- Morales E, Bustamante M, Vilahur N, Escaramis G, Montfort M, de Cid R, et al. DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med.*2012;185:937-43.
- Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, Pratt B, Hammond SK, Balmes J, et al. Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Oct;126(4):845- 52.e10. PubMed PMID: 20920773. Epub 2010/10/06. eng.
- Naumova AK, Al Tuwaijri A, Morin A, et al. Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. *Hum Genet* 2013; 132:811–822.
- Ng, H. H. and Bird, A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 158–163.
- Noal RB, Menezes AM, Macedo SE, Dumith SC. Childhood body mass index and risk of asthma in adolescence: a systematic review. *Obes Rev.* 2011 Feb;12(2):93-104.
- O’Byrne PM, Lamm CJ, Busse WW, Tan WC, Pedersen S; START Investigators Group. The effects of inhaled budesonide on lung function in smokers and nonsmokers with mild persistent asthma. *Chest* 2009; 136(6): 1514-20.
- Ober C, Hoffjan S Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006;7:95–100
- Ober C, Yao TC The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 2011; 242:10–30
- Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(2):274-8.

- Pascual M, Suzuki M, Isidoro-Garcia M, Padron J, Turner T, Lorente F, et al. Epigenetic changes in B lymphocytes associated with house dust mite allergic asthma. *Epigenetics*. 2011;6:1131-7.
- Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, et al. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One*. 2009;4:e4488. perspectives. In: Sigsgaard T, Heederik D, eds. *Occupational Asthma*. Basel, Birkhäuser/Springer Verlag AG, 2010; pp. 1–15.
- Peter-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31(3): 3-7.
- Peters MC, Mekonnen ZK, Yuan S, Bhakta NR, Woodruff PG, Fahy JV. Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):388-94.
- Rakyan V. K., T. A. Down, D. J. Balding, ja S. Beck.. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature Review Genetics* 2011; 12: 529–541.
- Rakyan V.,K., T. A. Down, N. P. Thorne, ja teised.. An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome research* 2008;18: 1518-1529.
- Rakyan, V. K. et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol*. 2, e405 (2004).
- Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2010; 447, 425-432.
- Reinius LE, Gref A, Saaf A, Acevedo N, Joerink M, Kupczyk M, et al. DNA methylation in the Neuropeptide S Receptor 1 (NPSR1)promoter in relation to asthma and environmental factors. *PloS One*. 2013;8:e53877.
- Reinius, L.E., N. Acevedo, M. Joerink, ja teised. 2012. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS ONE* 7: e41361.
- Robinsin DS. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsivness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1): 58-65.
- Rossnerova A, Tulupova E, Tabashidze N, Schmuczerova J, Dostal M, Jr PR, et al. Factors affecting the 27K DNA methylation pattern in asthmatic and healthy children from locations with various environments. *Mutation research*. 2013 Jan-Feb;741-742:18-26.
- Runyon RS, Cachola LM, Rajeshuni N, et al. Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells. *PLoS One* 2012; 7:e48796.
- Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003; 349(15): 1414-22
- Shore SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(5): 1087-93
- Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (5): 1501-7
- Skinner, M. K., Manikkam, M. & Guerrero-Bosagna, C.. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*, 2010; 21, 214-22.
- Slaats GG, Reinius LE, Alm J, Kere J, Scheynius A, Joerink M. DNA methylation levels within the CD14 promoter region are lower in placentas of mothers living on a farm. *Allergy*. 2012;67:895-903.
- Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(6): 1202-5.

- Soler Artigas M, Loth DW, Wain LV, Gharib SA, Obeidat M, Tang W, et al. Genome-wide association and large-scale follow up identifies 16 new loci influencing lung function. *Nat Genet.* 2011;43:1082-90.
- Soto-Ramirez N, Arshad SH, Holloway JW, Zhang H, Schaubberger E, Ewart S, et al. The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clinical epigenetics.* 2013;5:1.
- Stefanowicz D, Hackett TL, Garmaroudi FS, et al. DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One* 2012; 7:e44213.
- Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354(9178): 541-5.
- Zambrano JC, Carper HT, Rakes GP, Patrie J, Murphy DD, Platts-Mills TA, et al. Experimental rhinovirus challenges in adults with mild asthma: response to infection in relation to IGE. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (5): 1008-16
- Zhang H, Tong X, Holloway JW, Rezwan FI, Lockett GA, Patil V, Ray M, Everson TM, Soto-Ramírez N, Arshad SH, Ewart S, Karmaus W. The interplay of DNA methylation over time with Th2 pathway genetic variants on asthma risk and temporal asthma transition. *Clin Epigenetics.* 2014 Apr 15;6(1):8
- Tang WY, Levin L, Talaska G, Cheung YY, Herbstman J, Tang D, et al. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and 5'-CpG methylation of interferon-gamma in cord white blood cells. *Environmental health perspectives.* 2012;120:1195-200.
- Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, et al. Genomewide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma. *N Engl J Med* 2011; 365: 1173–83.
- Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet* 2002;360:1313–22.
- Teschendorff A. E., F. Marabita, M. Lechner, et al. 2012. A Beta-Mixture Quantile Normalisation method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450k DNA methylation data. *BMC Bioinformatics.* 2012: 1-8.
- The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998;12:315–35.
- Thomsen SF, van der Sluis S, Kyvik KO, Skytthe A, Backer V Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:1054–1061
- Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 2011; 43: 887–92.
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L. & Schübeler, D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005; 37, 853-62.
- Venables KM, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *Lancet* 1997; 349(9063): 1465-9.
- Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(12): 1622-8.
- Vercelli D Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:169–182
- Wiener A, Zieve I, Fries J The inheritance of allergic disease. *Ann Eugen* 1938;7:141–162
- Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(5):895-901
- Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 376–387.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

www.genome.gov/gwastudies

LISAD

Lisa 1. tabel differentsiaalselt metüleeritud geenidest $p < 0.001$ (korrigeerimata)

CpG sait	Geen	Kromo- soom	Regiooni laius	Metülatsooni erinevuse kordaja	Standard- viga	p -väärtus	FDR
ch.12.193030F	CHD4	12	1	0,0175	0,0035	9,7E-07	0,1908
cg21450318	MLLT1	19	1	0,0052	0,0012	3,9E-05	0,9996
cg16279290	SHANK2	11	53	0,0134	0,0032	5,5E-05	0,9996
cg21130255							
cg11881599	CLLU1OS	12	1	0,0157	0,0040	1,4E-04	0,9996
cg02319016	PAK2	3	1	0,0146	0,0038	1,4E-04	0,9996
cg20263733	ATP2C1	3	1	0,0112	0,0029	1,6E-04	0,9996
cg07395000	TECPR1	7	19	-0,0031	0,0008	1,8E-04	0,9996
cg07811634							
cg07209977	KIAA1026	1	1	0,0101	0,0026	1,8E-04	0,9996
cg08105265	EPX	17	118	0,0095	0,0025	2,1E-04	0,9996
cg03519593							
cg18537383	MCPH1	8	1	0,0109	0,0029	2,1E-04	0,9996
cg04468092	LGI2	4	1	0,0107	0,0028	2,3E-04	0,9996
cg10103235	RPIA	2	1	-0,0083	0,0022	2,5E-04	0,9996
cg19124300	PCCB	3	1	0,0199	0,0053	2,5E-04	0,9996
cg27469152	EPX	17	1	0,0149	0,0040	2,7E-04	0,9996
cg10451724	PLEC1	8	207	-0,0032	0,0009	2,8E-04	0,9996
cg24120597							
cg16434940							
cg00611614							

cg09235308							
cg04018533							
cg00076936							
cg19448292							
cg14613878							
cg09227119						2,8E-04	0,9996
cg00414077	C20orf118	20	529	0,0092	0,0025		
						2,9E-04	0,9996
cg16118491	TRAPPC9	8	1	0,0091	0,0025		
						2,9E-04	0,9996
cg19725098	ACACA	17	1	0,0064	0,0017		
						2,9E-04	0,9996
cg04070427	CEP250	20	1	-0,0058	0,0016		
cg11491436							
cg13089369						2,9E-04	0,9996
cg12845900	MAPK10	4	978	-0,0119	0,0032		
						3,0E-04	0,9996
cg07099567	STON2	14	1	-0,0151	0,0041		
						3,1E-04	0,9996
cg24520885	MYST4	10	1	0,0165	0,0045		
						3,1E-04	0,9996
cg09556351	PBLD	10	1	-0,0131	0,0036		
						3,2E-04	0,9996
cg16692439	ASPHD2	22	1	0,0128	0,0035		
						3,4E-04	0,9996
cg07572223	TTC18	10	1	-0,0077	0,0021		
cg25173129						3,4E-04	0,9996
cg02970679	EPX	17	409	0,0105	0,0029		
cg21220721							
cg09249800						3,5E-04	0,9996
cg11699125	ACOT7	1	98	0,0189	0,0052		
						3,6E-04	0,9996
cg27109907	WWOX	16	1	-0,0077	0,0021		
						3,6E-04	0,9996
cg07915516	AXIN1	16	1	0,0165	0,0045		
cg17170839						4,0E-04	0,9996
cg27079740	GPM6A	4	558	0,0160	0,0044		

cg10502220							
cg03729337							
cg02564291							
cg19328475							
cg02081006							
cg23289079							
cg17786697						4,1E-04	0,9996
cg03776662	PRDM6	5	659	0,0051	0,0014		
cg02246876							
cg11070172							
cg01242348							
cg22904296							
cg02039171							
cg15377871						4,2E-04	0,9996
cg00554993	CEBPE	14	2035	0,0044	0,0012		
cg13645296						4,4E-04	0,9996
cg11266582	DAPK2	15	44	0,0126	0,0035		
cg05184016							
cg07970948						4,6E-04	0,9996
cg06558622	ZNF862	7	42	0,0135	0,0038		
cg23712522							
cg11075230						4,6E-04	0,9996
cg11574184	MGC70857	8	415	0,0063	0,0018		
cg06972908	ITGAL	16	1	0,0121	0,0034	4,8E-04	0,9996
cg18438345							
cg20377447						5,0E-04	0,9996
cg13983640	TSPO2	6	911	0,0057	0,0016		
cg12986327							
cg23996617							
cg07549194						5,1E-04	0,9996
cg08340482	PTH2	19	379	0,0069	0,0020		
cg26787239							
cg23943829						5,1E-04	0,9996
cg25368824	IL4	5	828	0,0080	0,0023		

cg01112801	CCT8	21	1	-0,0234	0,0066	5,2E-04	0,9996
cg26027442		14	1	0,009137	0,002589	0,000535	5,3E-04
cg09565310		5	1	0,012349	0,003501	0,000538	5,4E-04
cg26020826		1	1	-0,02036	0,005784	0,000555	5,5E-04
cg02652072		19	1	0,014074	0,004003	0,000561	5,6E-04
cg01297896							
cg00564524							5,7E-04
cg20743749		8	1302	0,005055	0,001439	0,000566	
cg13047308							
cg27466532							5,7E-04
cg02321133		11	451	-0,00727	0,002072	0,000572	
cg04728919							
cg19942298							
cg13541788							
cg12233487							
cg23648082							
cg03243506							5,7E-04
cg19290962		20	1358	0,007088	0,00202	0,000574	
cg24976258		5	1	-0,01184	0,003381	0,000589	5,9E-04
cg26953137		17	1	0,011743	0,003357	0,000598	6,0E-04
cg13232075		1	1	0,112104	0,032065	0,000601	6,0E-04
cg22105022		9	1	-0,00455	0,001303	0,00061	6,1E-04
cg18124488		17	1	0,014564	0,004175	0,000618	6,2E-04
cg03557445		3	1	0,009372	0,002691	0,000631	6,3E-04
cg22614787		19	1	0,008249	0,00237	0,000633	6,3E-04

cg11638181	11	1	-0,00683	0,001965	0,000647	6,5E-04
cg19319487	11	1	0,015656	0,004508	0,000652	6,5E-04
cg11972890	19	1	-0,00514	0,00148	0,000658	6,6E-04
cg27385729	11	1	0,009337	0,002695	0,000671	6,7E-04
cg00987370	4	1	-0,01041	0,003012	0,000687	6,9E-04
cg07088882						6,9E-04
cg08043020	11	41	0,016518	0,004778	0,000689	6,9E-04
cg17034591	5	1	0,00856	0,002476	0,000689	6,9E-04
cg04591709	8	1	0,012493	0,003615	0,000691	6,9E-04
cg12247826						6,9E-04
cg26352502						6,9E-04
cg21564514	12	94	-0,00351	0,001015	0,000695	6,9E-04
cg05643188						7,0E-04
cg19730248						7,0E-04
cg15832577	1	648	0,012812	0,003712	0,000702	7,0E-04
cg18822243	12	1	0,019391	0,005619	0,000704	7,0E-04
cg25692507	19	1	0,01357	0,003939	0,000718	7,2E-04
cg03278639	3	1	0,009697	0,002819	0,000732	7,3E-04
cg25695378	4	1	-0,0061	0,001773	0,000734	7,3E-04
cg06624036	2	1	0,02588	0,007539	0,000749	7,5E-04
cg08996506	16	1	-0,00803	0,002341	0,000753	7,5E-04
cg12717533	2	1	0,011631	0,003392	0,000759	7,6E-04
cg13446420	9	1	0,006341	0,00185	0,000763	7,6E-04

cg20981000	13	1	0,018566	0,005423	0,000774	7,7E-04
cg00728029	8	1	0,008515	0,002488	0,000777	7,8E-04
cg05070839						
cg17475643						
cg11794801						
cg15678504						7,8E-04
cg02785561	8	581	0,003047	0,000891	0,00078	
cg15672653	11	1	0,015421	0,004516	0,000798	8,0E-04
cg11968436						
cg00335633						8,0E-04
cg23237364	19	238	0,003806	0,001115	0,000799	
cg12630606						8,0E-04
cg26981201	5	6	-0,01073	0,003143	0,000804	
cg25545917						8,1E-04
cg13105234	4	125	-0,01737	0,005092	0,000807	
cg08228217	7	1	-0,01247	0,003658	0,00081	8,1E-04
cg27140914	3	1	-0,00772	0,002266	0,000819	8,2E-04
cg08086385	3	1	0,011417	0,003353	0,000824	8,2E-04
cg09332506	1	1	0,009997	0,002941	0,000843	8,4E-04
cg09535526						
cg04983687						8,5E-04
cg05958985	16	173	0,011673	0,003436	0,000846	
cg12279125	8	1	0,014926	0,004398	0,000856	8,6E-04
cg00897329						8,6E-04
cg15256804	6	382	0,004602	0,001356	0,000856	
cg22478258						
cg18927901						
cg00980581						8,8E-04
cg26681975	6	197	0,009718	0,002871	0,000881	

cg02683846						
cg21900589						8,8E-04
cg05638250	8	679	-0,00419	0,001238	0,000884	
cg08277899	20	1	0,010305	0,003045	0,000886	8,9E-04
cg06075652	16	1	0,017736	0,005241	0,000887	8,9E-04
cg22221575	3	1	0,012126	0,003595	0,00092	9,2E-04
cg08949164						
cg05116343						
cg08877672						9,2E-04
cg07116194	16	163	0,003622	0,001074	0,000924	
cg17651451	5	1	0,013524	0,00402	0,000948	9,5E-04
cg23250085	1	1	0,011213	0,003334	0,000951	9,5E-04
cg20315954	17	1	0,010986	0,00327	0,000961	9,6E-04
cg26459079	12	1	-0,00735	0,002188	0,000965	9,7E-04
cg00866632	3	1	0,008162	0,002432	0,000975	9,8E-04
cg26246590	19	1	0,012419	0,003702	0,000978	9,8E-04
cg04318619						9,9E-04
cg16483033	17	142	-0,00557	0,001663	0,000993	

Lisa 2 tabel.Erialases kirjanduses astmaga seostatud geenid

Geeninimi	Kromosoom
<i>LPIN2</i>	18p11.31
<i>STARD13</i> <i>RP11-81F11.3</i>	13q13.1
<i>PRKCQ</i>	10p15.1
<i>SLC24A2</i>	9p22.1
<i>P2RY2</i>	11q13.4
<i>CPS1</i>	2q34

<i>UPK3A</i>	22q13.3
<i>EMX2</i>	10q26.1
<i>YES1</i>	18p11.32
<i>IL12RB1</i>	19p13.1
<i>PRKCQ</i> <i>IL15RA</i> <i>IL2RA</i> <i>KLF6</i>	10p15
<i>COL22A1</i>	8q24.2
<i>HLA-DQA1</i>	6p21.3
<i>HLA-DPB1</i>	6p21.3
<i>IL1RL1</i> <i>IL18R1</i>	2q12
<i>BTNL2</i> <i>HLA-DRA</i>	6p21.3
<i>SPATS2L</i>	2q33
<i>ORMDL3</i>	17q12
<i>C5orf56</i>	5q31.1
<i>ACO1</i>	9p21
<i>ZNF665</i>	19q13.4
<i>NDFIP1</i>	5q31.3
<i>IL6R</i>	1q21.3
<i>LRRC32</i>	11q13.5
<i>PRKG1</i>	10q21.1
<i>PCDH20</i>	13q21.3
<i>NOTCH4</i>	6p21.3
<i>TSLP</i>	5q22
<i>PBX2</i>	6p21.3
<i>LOC338591</i>	10p14
<i>C6orf10</i>	6p21.3
<i>HLA-DQB1</i>	6p21.3
<i>IKZF4</i>	12q13.2
<i>LOC729675</i>	4q31.2
<i>HLA-DQA2</i>	6p21.3

<i>GSDMB</i>	17q12
<i>TSLP</i>	5q22
<i>IL33</i>	9p24
<i>PYHIN1</i>	1q23
<i>C11orf71</i>	11q23.2
<i>CRCT1</i>	1q21.3
<i>SLC30A8</i>	8q24.1
<i>HLA-DPB1</i>	6p21.3
<i>HLA-DQ</i>	6p21.3
<i>IL33</i>	9p24
<i>IL18R1</i>	2q12
<i>SMAD3</i>	15q22.3
<i>GSDMA</i>	17q21.1
<i>IL2RB</i>	22q12.3
<i>RORA</i>	15q22.2
<i>IL13</i>	5q31.1
<i>SLC22A5</i>	5q31.1
<i>RAD50</i>	5q31.1
<i>SCG3</i>	15q21.2
<i>KIAA1271</i>	20p13
<i>DENND1B</i>	1q31
<i>CRB1</i>	
<i>TLE4</i>	9q21.3
<i>CHCHD9</i>	
<i>PDE4D</i>	5q12
<i>CTNNA3</i>	10q21.3
<i>CD14</i>	5q31.1
<i>TLR2</i>	
<i>TLR4</i>	
<i>TLR6</i>	
<i>TLR10</i>	
<i>NOD1</i>	
<i>NOD2</i>	
<i>IL10</i>	1q31-q31

<i>TGFB1</i>	19q13.1
<i>STAT3</i>	
<i>PTGER2</i>	
<i>GATA3</i> <i>TBX21</i> <i>IL4</i> <i>IL4RA</i> <i>FCER1B</i> <i>IL5</i> <i>IL5RA</i> <i>STAT6</i> <i>IL12B</i>	5q31.1 16p12.1-p12.2 12q13
<i>CCL5</i> <i>CCL11</i> <i>CCL24</i> <i>CCL26</i>	17q11.2-q12 17q11.2-q12
<i>DEFB1</i>	
<i>CC16</i>	11q12.3
<i>SPINK5</i> <i>FLG</i>	5q32 1q21.3
<i>ADAM33</i> <i>DPP10</i> <i>PHF11</i> <i>GPRA</i> <i>HLA-G</i> <i>IRAKM</i>	20p11.23 7p14.3
<i>COL29A1</i>	
<i>GSTMI</i>	1p13.3
<i>CTLA4</i>	2q33
<i>ADRB2</i>	5q31-q32
<i>HAVCRI</i>	5q33.2
<i>LTC4S</i>	5q35
<i>LTA</i>	6p21.3
<i>TNF</i>	6p21.3
<i>HLA-DRB1</i>	6p21

<i>NAT2</i>	8p22
<i>FCER1B</i>	11q13
<i>GSTP1</i>	11q13
<i>IL18</i>	11q22.2-q22.3
<i>NOS1</i>	12q24.2-q24-31
<i>CMA1</i>	14q11.2
<i>ACE</i>	17q23.3
<i>TBXA2R</i>	19p13.3
<i>GSTT1</i>	22q11.23

Lisa 3 tabel differentiaalselt metüleeritud kandidaatgeenidest valimis

CpG sait	Geeninimi	Kromo- soom	Regiooni laius	Metülatsooni erinevuse kordaja	Standard- viga	<i>p</i> -väärtus	FDR
cg26787239	<i>IL4</i>	5	828	0,007969	0,00225	0,0005	0,387
cg23943829							
cg25368824							
cg01815645	<i>HLA- DRB1</i>	6	1	-0,02382	0,007395	0,0015	0,5775
cg18897025	<i>TSLP</i>	5	1	-0,01288	0,004336	0,0034	0,5998
cg17738684	<i>IL1RL1</i>	2	621	0,007431	0,002539	0,0039	0,5998
cg16386158							
cg11916609							
cg19969733							
cg25464787	<i>PYHIN1</i>	1	696	-0,00543	0,001858	0,004	0,5998
cg00112929							
cg01550445	<i>P2RY2</i>	11	1	0,009782	0,003799	0,0109	0,9989
cg27301649	<i>COL29A1</i>	3	1	-0,00834	0,003387	0,0148	0,9989
cg17159093	<i>SPATS2L</i>	2	93	0,003632	0,001485	0,0154	0,9989
cg13972676							
cg24419828							
cg01206537							
cg04283868							
cg06226703	<i>SPATS2L</i>	2	1	0,006032	0,002474	0,0158	0,9989
cg16287734	<i>P2RY2</i>	11	1	0,00832	0,003458	0,0172	0,9989
cg22012693	<i>COL22A1</i>	8	1	0,006715	0,002819	0,0183	0,9989
cg11303839	<i>CCL26</i>	7	1	0,017973	0,007653	0,02	0,9989
cg01068906	<i>NOD2</i>	16	120	-0,00421	0,001799	0,0203	0,9989
cg01055281							
cg08195491							
cg13855852	<i>IL2RA</i>	10	1	0,004339	0,001869	0,0214	0,9989
cg06584121	<i>IL13</i>	5	36	0,005506	0,002387	0,0223	0,9989
cg06967316							
cg01200186	<i>PRKG1</i>	10	1	-0,00571	0,002513	0,0244	0,9989
cg25330422	<i>STAT3</i>	17	1	0,009762	0,004304	0,0246	0,9989
cg19025272	<i>SPATS2L</i>	2	1	0,006167	0,002829	0,0306	0,9989
cg11926456	<i>CPS1</i>	2	1	0,010191	0,004737	0,0328	0,9989
cg03669298	<i>GATA3</i>	10	374	0,003214	0,001498	0,0333	0,9989
cg22892607							

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Carmen-Kristiina Parik
(sünnikuupäev: 23.02.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Astmaga seotud DNA metülatsiooni muutused veres.
mille juhendajad on Lili Milani, Ph.D ja Silva Kasela M. Sc.

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014